

# **Univerzita Karlova**

## **Přírodovědecká fakulta**

**Studijní program: Biologie**

**Studijní obor: Imunologie**



**Bc. Filip Jabůrek**

**Studium vlivu mezenchymálních kmenových buněk v kombinaci  
s imunosupresivní terapií na zánětlivou odpověď v *in vivo* modelu**

**Study of the effect of mesenchymal stem cells in combination with  
immunosuppressive therapy on inflammatory response in *in vivo* model**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Školitelka: doc. RNDr. Magdaléna Krulová PhD.**

**Praha, 2019**

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Tato práce ani její část nebyla použita pro získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Podpis

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval své školitelce doc. RNDr. Magdaléně Krulové PhD. za vstřícnost a cenné zkušenosti, které mi byly nápomocny během psaní diplomové práce. Dále bych rád poděkoval všem členům laboratoře Imunoregulací (katedra buněčné biologie, PřF UK, Praha) za skvělé pracovní prostředí. Obzvláště velký dík patří mojí konzultantce RNDr. Michaele Hájkové PhD., za vstřícnost a ochotu, s jakou mi neváhala poskytnout pomoc během vypracovávání diplomové práce. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat také svojí rodině, za podporu a pochopení, které mi poskytovali po celou dobu studia.

## Abstrakt

Po mnoho let jsou používána imunosupresivní léčiva při léčbě autoimunitních onemocnění a potransplantační léčbě. Ovšem tato léčiva přináší mimo svých nesporných výhod také celou řadu nežádoucích vedlejších účinků. Nejčastěji se vyskytujícími nežádoucími účinky jsou například zvýšený krevní tlak, zhoršená funkce ledvin a náchylnost k běžným infekcím.

V posledních letech proto vyvstala otázka možnosti využití jiných léčebných postupů, které by s sebou nešly tyto negativní efekty. Jedním z nově zkoumaných přístupů je aplikace mezenchymálních kmenových buněk (MSCs), které disponují přednostmi jako jsou imunomodulační schopnosti, bezpečnost a relativně snadná dostupnost. Samotné použití kmenových buněk ovšem nepřináší dostatečně silnou imunomodulaci. Navzdory rozsáhlému výzkumu MSCs je jen malá část zaměřena na jejich použití v kombinaci s imunosupresivní terapií. Proto jsem se ve své práci zaměřil na použití nižších dávek imunosupresivní terapie ve spojení s kmenovými buňkami. Kombinovaná terapie přináší výhody obou přístupů, jelikož je díky ní možné snížit negativní vedlejší účinky imunosupresiv. To je umožněno podáním jejich nižší dávky, která ovšem stále ve spojení s MSCs poskytuje dostatečně silnou inhibici imunitní odpovědi v porovnání s běžně užívanými postupy.

Cílem mé práce proto bylo sledovat změny v experimentálním *in vivo* myším modelu transplantace. Změny byly pozorovány mezi jedinci léčenými klasickým přístupem za použití imunosupresiva cyklosporinu A (CsA) a jedinci léčenými pomocí kombinované terapie (CsA a MSCs). Z výsledků je patrné, že kombinovaná terapie snižuje hladiny prozánětlivých cytokinů a moduluje zastoupení jednotlivých populací T lymfocytů. Souhrnně výsledky ukazují na změnu vztahu mezi prozánětlivými a protizánětlivými populacemi směrem k protizánětlivým, což má pozitivní vliv na hojivé procesy a přijmutí transplantátu.

**Klíčová slova:** mezenchymální kmenové buňky, transplantace, zánět, cyklosporin A, CsA

## Abstract

Immunosuppressive drugs have been used for many years for the treatment of autoimmune diseases and post-transplantation treatment. While these drugs have a lot of advantages, they also show several undesirable side effects. The most common side effects are higher blood pressure, lowered renal function and susceptibility to infections.

Therefore, in recent years there has been a demand for other medical approaches that do not exhibit the above-mentioned adverse effects. Among one of the newly tested approaches is the application of mesenchymal stem cells (MSCs), which possess several advantages such as immunomodulatory abilities, safety and relatively easy isolation, however, stem cell use alone has not yet provided sufficiently strong immunomodulation. Only a small part of research of MSCs is focused on their use in the combination with immunosuppressive therapy. Therefore, in my thesis I focused on the model which allows to reduce the dose of immunosuppressive drugs in the combination with MSCs. Combined therapy is more advantageous than both monotherapies thanks to lower dosages of these drugs used. It enables to decrease negative side effects of immunosuppressive drugs, when combined with MSCs to provide sufficient immunomodulation in comparison to classical therapy.

The aim of my work was to study the differences in experimental *in vivo* mouse model of transplantation. Changes in distinct T cell populations and related cytokine production were analysed in mice undergoing classical approach with the use of immunosuppressive drug cyclosporin A (CsA) and mice treated with combined therapy (CsA and MSCs). Taken together our results have shown a shift in balance of proinflammatory and anti-inflammatory immune reactions in the direction of anti-inflammatory, which has a positive effect on healing processes and graft acceptance.

**Key words:** mesenchymal stem cells, transplantation, inflammation, cyclosporin A, CsA

# Obsah

1	Seznam použitých zkratk	8
2	Úvod	12
3	Cíl práce	13
4	Literární přehled	14
4.1	Mezenchymální kmenové buňky	14
4.2	Modulační schopnosti MSCs	15
4.2.1	Vliv MSC na T lymfocyty	20
4.2.2	Vliv MSCs na ostatní buňky imunitního systému	24
4.3	MSCs a jejich terapeutické využití	25
4.4	Cyklosporin A	26
4.5	MSCs v kombinaci s imunosupresivní terapií	27
4.6	Bezpečnost terapie pomocí MSCs a její budoucnost	28
5	Metody a materiál	29
5.1	Zvířata	29
5.2	Média a roztoky	29
5.3	Technické vybavení	29
5.4	Software	30
5.5	Myší model transplantace	30
5.6	Izolace a kultivace MSC	30
5.7	Izolace a kultivace splenocytů	31
5.8	Kultivační testy	31
5.9	Průtoková cytometrie	32
5.10	ELISA	34
5.11	Jednostranná MLC	35
5.12	Diferenciace MSC	35
5.13	Mikroskopie MSCs	36
5.14	Migrace MSCs	36
5.15	Statistická analýza	37
6	Výsledky	38
6.1	Myší model	38
6.2	Použité MSCs	39
6.2.1	Diferenciace MSCs	40

6.3	Změny v počtu T lymfocytů .....	42
6.4	Th 1 populace .....	43
6.5	Th 17 populace .....	45
6.6	Th 2 populace .....	47
6.7	T <sub>reg</sub> populace .....	49
6.8	Aktivace T lymfocytů .....	50
6.9	Jednostranná MLC.....	52
6.10	Migrace MSC v organismu.....	53
7	Diskuse .....	56
8	Závěr.....	60
9	Zdroje .....	61

## 1 Seznam použitých zkratk

A700	Alexa Fluor 700
AP-1	activator protein 1, aktivátorový protein 1
AP-3	adaptor protein complex 3, komplex adaptorových proteinů 3
APC	allophycocyanine, alofykocyanin
Arg1	arginase coding gene 1, gen kódující arginázu 1
B6	abbreviation for C57BL/6 mouse strain, zkratka pro myši kmen C57BL/6
BAFF	B cell activating factor, aktivační faktor B buněk
BSA	bovine serum albumin, albumin z hovězího séra
CCL	chemokine C-C motif ligand, ligand chemokinu struktury C-C
CCR	chemokine C-C motif receptor, receptor chemokinu struktury C-C
CD	cluster of differentiation, diferenciační skupina
CD28re	cluster of differentiation 28 response element, jednotka odpovědi diferenciační skupiny 28
CO <sub>2</sub>	carbon dioxide, oxid uhličitý
ConA	concanavalin A, konkanavalín A
COX-2	cyclooxygenase 2, cyklooxygenáza 2
CsA	cyclosporin A, cyklosporin A
CXCL	chemokine C-X-C motif ligand, chemokinový ligand struktury C-X-C
DAP	death-associated protein 1, protein asociovaný s buněčnou smrtí 1
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole, 4',6-diamidin-2-fenolindol
DC	dendritic cell, dendritická buňka
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethylsulfoxide, dimethyl sulfoxid



ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay, test imunoenzymatické reakce
EP4	prostaglandin E2 receptor 4, receptor 4 prostaglandinu E2
Fas	cell death receptor Fas, receptor buněčné smrti Fas
FasL	cell death receptor Fas ligand, ligand Fas receptoru buněčné smrti
FCS	fetal calf serum, fetální telecí sérum
FITC	fluorescein isothiocyanate, fluorescentní isothiocyanát
Flt-3	fms-like tyrosin kinase 3 ligand, ligand fms-like tyrosin kinázy
FoxP3	Forkhead box protein 3
Gal	galectin, galektin
GATA-3	GATA binding protein 3, GATA vázající protein 3
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, faktor stimulující kolonie makrofágů a granulocytů
GvHD	graft versus host disease, reakce štěpu proti hostiteli
HCl	hydrochloric acid, kyselina chlorovodíková
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HGF	hepatocyte growth factor, růstový faktor hepatocytů
HLA-G	human leukocyte antigen G, lidský antigen leukocytů G
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1, intercelulární adhezivní molekula 1
IDO	indoleamine-2,3-dioxygenase, indolamin-2,3-dioxigenáza
IFN	interferon, interferon
IFNAR	interferon alpha receptor alpha chain, alfa řetězec receptoru interferonu alfa
Ig	immunoglobulin, imunoglobulin
IL	interleukin, interleukin
IL-2R	interleukin 2 receptor, receptor interleukinu 2

IκB	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor alpha, inhibitor jaderného faktoru genu pro kappa lehký řetězec
JNK	c-Jun N-terminal kinase, c-Jun N-terminální kináza
LIF	leukemic inhibitory factor, leukemický inhibiční faktor
LPS	lipopolysaccharide, lipopolysacharid
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1, chemoatraktivní monocytární protein 1
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor, faktor stimulující kolonie makrofágů
MHC	major histocompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex
MIC-A	MHC class 1 polypeptide-related sequence A, sekvence A odpovídající MHC 1 polypeptidu
MIC-B	MHC class 1 polypeptide-related sequence B, sekvence B odpovídající MHC 1 polypeptidu
miRNA	micro ribonucleic acid, mikro ribonukleová kyselina
MLC	mixed lymphocyte reaction, směsná lymfocytární reakce
MSCs	mesenchymal stem cells, mezenchymální kmenové buňky
NF-AT	nuclear factor of activated T cells, jaderný faktor aktivovaných T buněk
NFκB	nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells, jaderný faktor kappa B
NK	natural killer cell, buňka přirozený zabiják
NKG2D	NK cell receptor D, receptor NK buněk D
NO	nitric oxide, oxid dusnatý
Oct-1	octamer-binding transcription factor 1, oktamer vázající transkripční faktor 1
p38	mitogen activated protein kinase 38, mitogenem aktivovaná protein kináza 38
PBS	phosphate buffer solution, roztok fosfátového pufru
PD-1	programmed cell death 1, receptor programované buněčné smrti 1
PD-L1	programmed death ligand 1, ligand receptoru programované buněčné smrti 1

PD-L2	programmed death ligand 2, ligand receptoru programované buněčné smrti 2
PE	phycoerythrin, fykoerytrin
PGE <sub>2</sub>	prostaglandin E2, prostaglandin E2
PKC	protein kinase C, protein kináza C
PKR	protein kinase R, protein kináza R
PMA	phorbol-12-myristate-13-acetate, forbol-12-myristát-13-acetát
ROR $\gamma$ t	thymus specific RAR related orphan receptor gamma, pro thymus specifický s RAR související receptor gamma
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640 medium
SCF	stem cell factor, faktor kmenových buněk
Spl	splenocytes, buňky sleziny
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3, aktivátor transkripce 3
T-bet	T-box transcription factor, T-box transkripční faktor
TGF- $\beta$	transforming growth factor beta, transformující růstový faktor beta
Th	T helper cell, pomocná T buňka
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor alpha, faktor nekrotizující nádory alfa
T <sub>reg</sub>	T regulatory cell, regulační T lymfocyt
TRIF	TIR-domain containing adapter inducing IFN- $\beta$ , adaptor obsahující doménu TIR indukující IFN- $\beta$
VCAM-1	vascular cell adhesion protein 1, adhezivní protein vaskulárních buněk
VEGF	vascular endothelial growth factor, vaskulární endotelový růstový faktor

## 2 Úvod

Od svého objevu ve druhé polovině 20. století prošel pohled na MSCs (mesenchymal stem cells, mezenchymální kmenové buňky) výrazným vývojem. Od popisu jejich vlastností, přes definování kritérií, které by měly buňky splňovat, aby mohly být uznány za MSCs až po současný stav poznání a jejich potenciální využití v klinickém prostředí. V počátcích nepříliš zajímavé buňky se staly středem zájmu mnoha pracovišť, které využívají jejich prokázaných imunomodulačních vlastností, při snaze aplikovat je na nejrůznější druhy onemocnění. Jak experimentálně v laboratořích, tak v případě klinických testů, kdy jsou MSCs používány jako terapie pro léčbu GvHD (graft versus host disease, reakce štěpu proti hostiteli), osteoporosis imperfecta a jako podpůrná terapie během léčby diabetu prvního typu nebo stavů spojených s následky transplantace. V posledních letech se jejich výzkum zaměřil také na možnost jejich použití společně s imunosupresivní terapií, kde bylo dokázáno, že MSCs mají značnou schopnost snižovat vedlejší efekty, které sebou tato léčba nese. Vhodné kandidáty pro tento přístup z nich udělala především jejich schopnost modulace imunitního systému, a to jak prostřednictvím povrchových molekul přímým buněčným kontaktem, tak pomocí produkovaných solubilních molekul. Zároveň s tím imunitní systém toleruje MSCs, které pochází od jiného dárce, a dokonce i buňky, které byly zmnoženy *in vitro*. Mimo určitou formu imunoprivilegovanosti nebylo dosud dokázáno, že by MSCs po své aplikaci tvořily nádory a jsou tak bezpečnou formou terapie. Mimo to bylo v několika posledních letech ukázáno na schopnost extracelulárních váčků izolovaných z MSCs působit velmi podobným efektem, přičemž tato terapie dále snižuje rizika spojená s aplikací buněk jako takových. Kromě toho bylo velmi podobných výsledků, jako při podání MSCs, dosaženo v některých případech i po podávání kondicionovaného média získaného z těchto buněk. Je proto velká pravděpodobnost, že dále pokračující výzkum odhalí nové terapeutické možnosti použití těchto buněk a terapie založená na MSCs se stane obecně používaným přístupem, kterým bude možné léčit některé choroby.

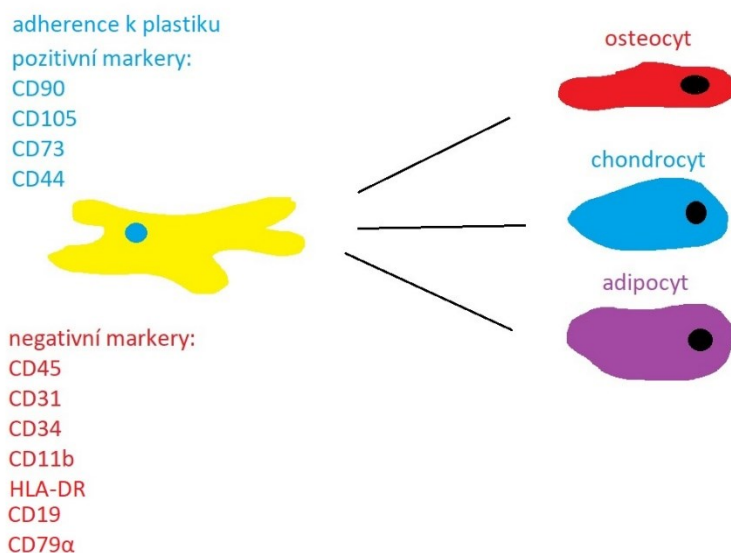
### 3 Cíl práce

V rámci transplantace jsou standardně podávána imunosupresivní léčiva, s těmi je ale spojena celá řada vedlejších účinků. Jako jednou z příležitostí alternativního přístupu k léčbě se jeví možnost buněčné terapie. V tomto ohledu je aplikace MSCs vhodná především z důvodu jejich imunomodulačních vlastností a relativně snadné dostupnosti. Cílem této práce bylo analyzovat použití MSCs společně s relativně nízkými dávkami cyklosporinu A (CsA) a porovnání výsledků kombinované terapie s výsledky obou monoterapií. Na myším modelu alogenní transplantace jsem proto analyzoval cytokinový profil a zastoupení populací T lymfocytů, proliferaci T lymfocytů a přežívání a migraci MSCs v jednotlivých jedincích, kterým byla aplikována rozdílná terapie.

## 4 Literární přehled

### 4.1 Mezenchymální kmenové buňky

Za první zmínku o MSCs můžeme považovat popis Friedensteina *et.al.*, který ve své publikaci hovoří o buňkách podobných fibroblastům. Tyto buňky byly schopné diferencovat a byly získány z kostní dřene (Friedenstein, Piatetzky-Shapiro and Petrakova, 1966). MSCs jsou multipotentní buňky jejichž populace je udržována pomocí sebeobnovování. V roce 2006 byla stanovena základní kritéria, která musí buňka splňovat, aby byla považována za MSC. Jedná se o adhezenci k plastu, schopnost diferenciace do osteocytů, chondrocytů a adipocytů. Dále se jedná o expresi markerů CD (cluster of differentiation, diferenciální skupina) 105, CD73, CD90. Zároveň nesmí tyto buňky exprimovat markery typické pro hematopoetickou linii, jako je CD45, CD34, CD11b, CD31 *aj.* (viz. obr. 1). Bohužel dosud nebyly objeveny žádné markery typické pouze pro MSCs (Dominici *et al.*, 2006).



**Obrázek 1 – Jednoduché schéma požadavků, které musí buňka splňovat, aby mohla být nazvána MSCs, CD (cluster of differentiation)**

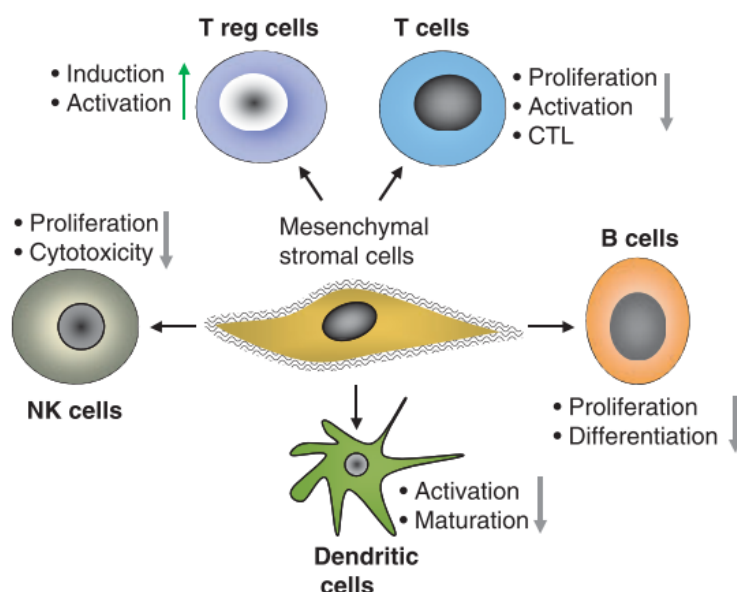
MSCs mohou být získávány z různých tkání, mezi které patří například kostní dřev, pupečníková krev nebo tuková tkáň. V *in vitro* podmínkách je potom lze relativně lehce kultivovat a násobit jejich množství (Le Blanc, 2003). MSCs pocházející z různých zdrojů mají rozdílné inhibiční vlastnosti, jak bylo ukázáno v publikaci Ribeiro *et al.* Z jejich výsledků vyplývá, že nejlepší inhibiční vlastnosti poskytuje populace MSCs získaná z tukové tkáně, takto získané buňky byly schopny inhibovat jak CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocyty, B buňky, tak i NK (Natural Killer, přirození zabijáci) buňky (Ribeiro *et al.*, 2013).

Na základě přítomnosti mRNA byla zjištěna exprese genů pro IL (interleukin) -6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14 a IL-15. Kromě interleukinů byla detekována také mRNA růstových faktorů LIF (leukemic inhibitory factor, leukemický inhibiční faktor), M-CSF (macrophage colony-stimulating factor, faktor stimulující kolonie makrofágů), ligandu Flt-3 (fms-like tyrosin kinase 3, fms-like tyrosin kináza 3) a SCF (stem cell factor, faktor kmenových buněk). Produkce zmíněných faktorů podporuje diferenciaci hematopoetických buněk (Majumdar *et al.*, 1998). MSCs jsou také schopny prezentovat antigen a to jak klasickou cestou tak pomocí zkřížené prezentace (Galipeau *et al.*, 2009). *In vitro* kultivované MSCs postupně s dobou kultivace ztrácí svou imunoprivilegovanost. Od 10 pasáže se tak začínají projevovat nežádoucí efekty aktivace imunitního systému. Po 14 pasáži vykazují MSCs imunostimulační vlastnosti, zatímco jejich supernatant vykazuje silné imunoinhibiční vlastnosti. Z toho vyplývá, že pro imunoinhibiční funkci MSCs je důležitý buněčný kontakt, ale také solubilní faktory (Liu *et al.*, 2012). Současně s nárůstem imunostimulačních schopností se zvyšuje také náchylnost buněk k senescenci a neschopnost reagovat na diferenciací podněty *in vitro* (Gu *et al.*, 2016). Na imunomodulační schopnosti MSCs působí také stáří dárce, jak bylo ukázáno u MSCs pocházejících ze starších dárců, kde byla potlačena schopnost inhibovat T lymfocyty (Wu *et al.*, 2014).

## 4.2 Modulační schopnosti MSCs

Bylo dokázáno, že MSCs jsou schopny modulovat imunitní systém a zároveň nejsou imunitním systémem rozeznávány jako nebezpečné. MSCs působí na T lymfocyty prostřednictvím mechanismů, jež jsou nezávislé na MHC (major histocompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex), jelikož jak autologní, tak alogenní buňky byly schopné podporovat proliferaci T lymfocytů ve stejné míře. Současně bylo zjištěno, že proliferace T lymfocytů nesouvisí příliš s podanou dávkou MSCs. Zároveň byly pozorovány inhibiční účinky MSCs v jednosměrné MLC (mixed lymphocyte culture, směsná lymfocytární kultura) kde opět nezáleželo na původu MSCs, ovšem velikost dávky MSCs již měla na inhibiční efekt vliv (Ringden *et al.*, 2003). Jak bylo zdokumentováno působení MSCs na imunitní systém nemusí vést vždy k inhibici. Podle publikovaných výsledků existují 2 populace MSCs. Tyto dvě populace pochází ze stejných buněk a k jejich vývoji dochází na základě stimulace specifických povrchových receptorů. Jedna z těchto populací vykazuje prozánětlivý fenotyp, zatímco druhá protizánětlivý. Efekt MSCs je proto často spíše modulační než inhibiční a navrácí organismu homeostázu (Waterman *et al.*,

2010). MSCs působí na všechny typy imunitních buněk, od buněk specifického imunitního systému jako jsou T lymfocyty až po buňky vrozeného imunitního systému, jako jsou NK buňky (viz. obr. 2).



**Obrázek 2 – Schéma vlivu MSCs na buňky imunitního systému** – MSCs jsou schopny modulovat buňky imunitního systému například potlačením proliferace a aktivace T a B buněk a aktivací  $T_{reg}$  a snížením cytotoxické aktivity NK buňka dendritických buněk, NK cell (natural killer cell, buňka přirozený zabiják), převzato (Sioud, 2011)

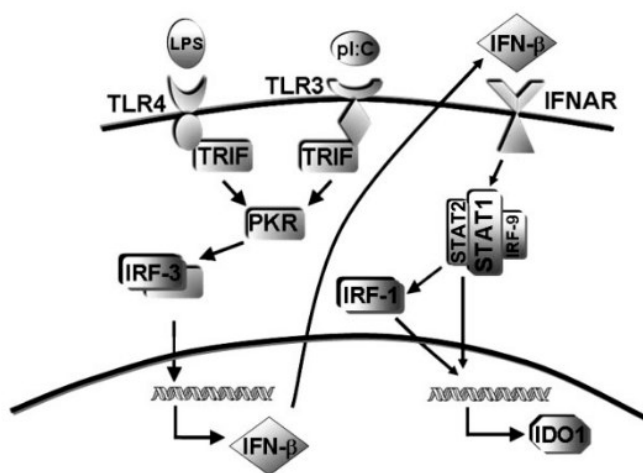
Pro modulační vlastnosti MSCs jsou důležité solubilní molekuly, kterých MSCs produkují celou řadu (tab. 1). Na základě výsledků získaných z *in vivo* myšího modelu byla dokázána schopnost MSCs produkovat  $PGE_2$  (prostaglandin E2), kterým působí inhibičně na jednotlivé populace imunitních buněk. Syntéza  $PGE_2$  není u MSCs konstitutivní, nýbrž je indukována IL-6 v místě zánětu. Díky  $PGE_2$  jsou tak MSCs schopny ovlivňovat rovnováhu mezi Th1/Th2 směrem k Th2 (Bouffi *et al.*, 2010).  $PGE_2$  produkované MSCs je mimo to schopné indukovat speciální typ regulačních T buněk. Tyto buňky jsou  $CD4^+IL-10^+IFN\gamma^-$  a působí inhibičně na MLC (Hsu *et al.*, 2013). Současně má  $PGE_2$  vliv na makrofágy, u kterých dochází k manifestaci protizánětlivého fenotypu (Ylöstalo *et al.*, 2012).

Dalším možným mechanismem podílejícím se na snížené reaktivitě imunitního systému proti MSCs je přítomnost HLA-G (human leukocyte antigen G, antigen lidských leukocytů G), která byla detekována jak u fetálních MSCs (Gotherstrom *et al.*, 2005), tak u MSCs pocházejících z dospělého dárce (Mazurier *et al.*, 2007). Exprese proteinů HLA-G je konstitutivní a nemění se po stimulaci. Po zablokování HLA-G příslušnou protilátkou dojde ke zvýšení proliferace T lymfocytů v MLC (Mazurier *et al.*, 2007).

Solubilní molekulou, která hraje v imunomodulačních vlastnostech MSCs velmi důležitou roli, je také enzym IDO (indoleamine-2,3-dioxygenase). Ten je mediátorem přeměny tryptofanu na kynurenin.



Kromě vyčerpání tryptofanu jsou pak i pozdější produkty metabolismu kynureninu schopné potlačovat proliferaci T lymfocytů (Meisel *et al.*, 2004). Významnou roli hraje v tomto mechanismu IFN (interferon)  $\gamma$ . MSCs vystavené působení IFN $\gamma$  jsou tímto cytokinem ovlivněny a dochází u nich k indukci protizánětlivého fenotypu. Takto ovlivněné buňky jsou schopny produkovat IDO (Krampera *et al.*, 2006). Jedním z nejdůležitějších producentů IFN $\gamma$  jsou CD8<sup>+</sup> T lymfocyty, jejichž kritická role v ovlivnění MSCs byla ukázána na modelu autoimunitního onemocnění lupus erythematosus, kde byly MSCs schopné zlepšit průběh nemoci právě působením IDO na T lymfocyty. Zajímavé je, že MSCs pocházející z pacientů trpících lupusem vykazovaly sníženou schopnost produkce IDO a jejich schopnost regulace imunitního systému tak byla potlačena (Wang *et al.*, 2014). Inhibiční schopnosti MSCs mediované produkcí IDO mohou být zesíleny prostřednictvím stimulace TLR3 a TLR4. Signalizační dráha vyvolaná vazbou ligandů na tyto receptory může vést k autokrinní produkci IFN $\beta$ . To spouští signalizaci, která má za následek zvýšení produkce IDO MSCs (viz obr.3) (Opitz *et al.*, 2009).



**Obrázek 3 – Schéma signalizace zvyšující produkci IDO** – Stimulace receptorů TLR3/4 vede ke spuštění signální kaskády, která má za následek zvýšení produkce IFN- $\beta$ , ten působí autokrinně na MSCs a zvyšuje jejich modulační vlastnosti spuštěním signální dráhy, na jejímž konci je produkce IDO (indolamin-2,3-dioxygenáza), TLR (Toll-like receptor), TRIF (TIR-domain containing adapter inducing IFN- $\beta$ , adaptér obsahující doménu TIR indukující IFN- $\beta$ ), IFN (interferon), IFNAR (interferon alpha/beta receptor alpha chain, alfa řetězec receptoru interferonu alpha/beta), STAT (signal transducer and activator of transcription, aktivátor transkripce), PKR (protein kinase R, protein kináza R), převzato (Opitz *et al.*, 2009)

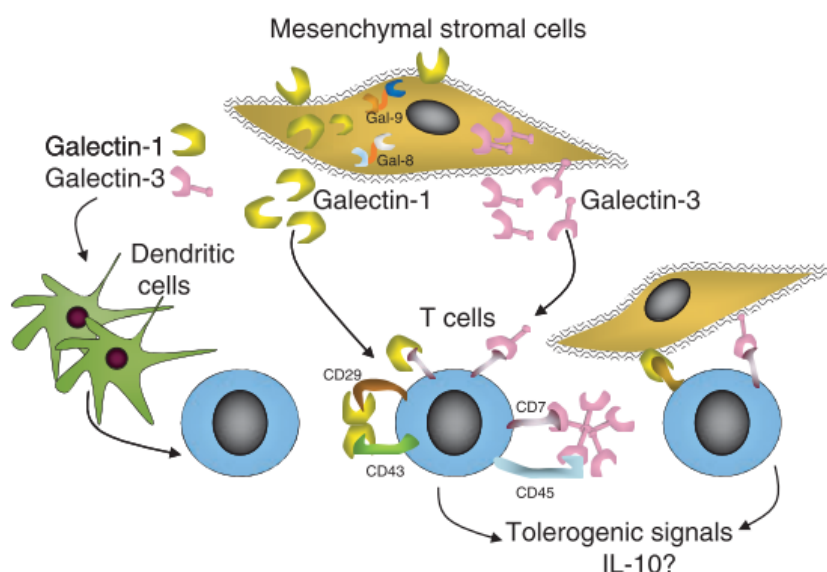
**Tabulka 1 – Souhrnný přehled solubilních faktorů, kterými mohou MSCs působit na buňky imunitního systému – dendritická buňka (DC), převzato a upraveno podle (Salami et al., 2018)**

HLA-G	inhibice periferních mononukleárních buněk
IDO	inhibice proliferace T lymfocytů
NO	inhibice buněčné aktivace
PGE-2	inhibice NK buněk a maturace DC, modulace T buněčné odpovědi
IL-6	inhibice diferenciac DC a proliferace T buněk
IL-10	inhibice T buněčné odpovědi a potlačení diferenciac Th17 buněk
VEGF	inhibice apoptózy
TGFβ a HGF	proliferace a produkce IFNγ
LIF	inhibice proliferace T buněk
BAFF	zvýšení proliferace B buněk

Kromě solubilních molekul se na modulaci imunitních reakcí pomocí MSCs podílí také buněčný kontakt (tab. 2). Jednou z molekul, která je za tento efekt zodpovědná je například FasL (cell death receptor Fas ligand, ligand receptoru buněčné smrti Fas). Ten je MSCs exprimován a po buněčném kontaktu s T lymfocyty indukuje jejich apoptózu. Současně MSCs exprimují Fas receptor (cell death receptor Fas, receptor buněčné smrti Fas), prostřednictvím kterého kontrolují syntézu MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1, chemoatraktivní monocytární protein 1). Chemotaktický protein MCP-1 je zodpovědný za migraci T buněk, což zajistí jejich buněčný kontakt s MSCs a zvyšuje se tak apoptotický efekt FasL (Akiyama *et al.*, 2012).

Dalším mechanismem, který hraje roli v imunosupresivní aktivitě MSCs je jejich schopnost exprimovat PD-1 (programmed cell death 1, receptor programované buněčné smrti 1), a jeho ligandy PD-L1 a PD-L2 (Augello *et al.*, 2005). Pro funkci PD-L1, který je jedním z inhibitorů imunitního systému, je klíčový buněčný kontakt mezi MSCs a buňkami exprimujícími PD-1. Proto je tato jejich schopnost závislá na dávce, v jaké jsou MSCs podány. Současně bylo dokázáno, že s přítomností IL-6 se zvýší schopnost MSCs exprimovat PD-L1 (Luz-Crawford *et al.*, 2012). V práci Di Trapani *et al.* se potom objevil důkaz, že pro imunosupresivní vlastnosti MSCs není nezbytný buněčný kontakt mezi MSC a modulovanou buňkou. V *in vitro* modelu ukázali na důležitost extracelulárních váčků, které měly vysokou expresi PD-L1 a zároveň obsahovaly 2 typy miRNA (micro ribonucleic acid, mikro ribonukleová kyselina) podílející se na modulaci zánětlivých reakcí (Di Trapani *et al.*, 2016). Výsledky skupiny Yan *et al.* také ukazují na schopnost MSCs zvyšovat expresi PD-1 na povrchu T buněk a jeho stimulací způsobit apoptózu těchto buněk (Yan *et al.*, 2015).

Důležitými molekulami, podílejícími se na imunomodulačních schopnostech MSCs, jsou galektiny (obr.4). Jak bylo ukázáno exprese galektinu-1 hraje důležitou roli ve schopnosti MSCs inhibovat proliferaci T lymfocytů. Po jeho knock-downu je proliferace T lymfocytů obnovena, zároveň galektin-1 pocházející z MSCs má schopnost inhibice aloreaktivních CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T lymfocytů a regulace produkce cytokinů (Bohringer *et al.*, 2010). Podobné vlastnosti byly prokázány také u dalšího zástupce rodiny galektinů a sice galektinu-3 (Sioud *et al.*, 2010). Později byly inhibiční vlastnosti objeveny také u galektinu-9. Ten působí především na B lymfocyty a je schopen zabránit produkci protilátek (Ungerer *et al.*, 2014).



**Obrázek 4 – Schéma působení galektinů na T lymfocyty** – MSCs jsou schopny exprimovat galektiny, jejichž prostřednictvím působí na buňky imunitního systému, CD (cluster of differentiation), IL (interleukin) převzato (Sioud, 2011)

**Tabulka 2 – Souhrnný přehled povrchových molekul odpovědných za imunomodulační vlastnosti MSCs**, PD-L (programmed death ligand, ligand receptoru programované buněčné smrti), Fas (cell death receptor Fas, receptor buněčné smrti Fas), FasL (cell death receptor Fas ligand, ligand receptoru buněčné smrti Fas)

PD-L1	inhibice imunitních buněk
PD-L2	inhibice imunitních buněk
FasL, Fas	indukce apoptózy, chemoatrakce
galektin 1	inhibice T lymfocytů
galektin 3	inhibice T lymfocytů
galektin 9	inhibice produkce protilátek
ICAM-1	inhibice T lymfocytů
VCAM-1	Inhibice T lymfocytů

#### 4.2.1 Vliv MSC na T lymfocyty

V práci Di Nicola et.al. bylo dokázáno, že MSCs mají schopnost potlačovat proliferaci T lymfocytů, a to jak po specifické, tak nespecifické stimulaci. Současně bylo ukázáno na roli TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta, transformující růstový faktor beta) a HGF (hepatocyte growth factor, růstový faktor hepatocytů), jako kritických hráčů v inhibici T lymfocytů, jelikož po blokaci těchto cytokinů specifickými protilátkami došlo k obnovení jejich proliferace (Di Nicola *et al.*, 2002). Zároveň

jsou MSCs schopny produkovat solubilní IL-2R (interleukin 2 receptor), jehož prostřednictvím opět potlačují proliferaci T lymfocytů (Rasmusson *et al.*, 2005).

Vlivem prozánětlivých cytokinů, především IFN $\gamma$ , IL-1 a TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , faktor nektortizující nádory  $\alpha$ ), dochází ke zvýšení exprese adhezivních molekul ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 1, intracelulární adhezivní molekula 1) a VCAM-1 (vascular cell adhesion protein 1, adhezivní protein vaskulárních buněk 1) na povrchu MSCs. Následně je zvýšena adheze MSCs a jejich schopnost vazby jak na T lymfocyty (Ren *et al.*, 2010), tak jejich schopnost adherovat k endoteliím a prostupovat do místa zánětu (Segers *et al.*, 2005). Stejná kombinace prozánětlivých cytokinů navozuje u MSCs produkci chemokinů CXCL (chemokine C-X-C motif ligand, ligand chemokinu struktury C-X-C) - 9 a CXCL-10, které jsou silnými atraktanty T lymfocytů. Současně s produkcí chemokinů dochází vlivem prozánětlivých cytokinů k produkci NO (nitric oxide, oxid dusnatý), což je silný inhibitor T lymfocytů, který ovšem působí pouze lokálně. Na základě chemokinového spádu dojde k migraci T lymfocytů do okolí MSCs, kde je vysoká koncentrace produkovaného NO a tím dojde k jejich inhibici (Ren *et al.*, 2008). MSCs jsou také schopny potlačovat expresi CD25 a CD38 na lymfocytech stimulovaných PHA (phytohaemagglutinin, fytohemagglutinin) a k tomuto potlačení dochází prostřednictvím solubilních molekul (Le Blanc *et al.*, 2004). Navození inhibice buněčným kontaktem s MSCs je silnější než samotné působení solubilních faktorů. Její míra pozitivně koreluje s hladinou exprese IDO, zatímco po zprostředkování buněčného kontaktu se přidávají další mechanismy a úroveň inhibice buněčné odpovědi koreluje s expresí IL-10 a TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ , transformující růstový faktor  $\beta$ ) (Fouillard *et al.*, 2008).

I v případě minoritních populací T lymfocytů, jako jsou například  $\gamma/\delta$  T lymfocyty platí, že jsou tyto populace působením MSCs inhibovány. Galimberti *et al.* ukázali, že po kontaktu  $\gamma/\delta$  T lymfocytů s MSCs dochází k inhibici jejich expanze, naproti tomu u již expandovaných buněk neměl kontakt žádný vliv na jejich funkci. Podobný efekt byl pozorován i v případě použití kondicionovaného média získaného z kultury MSCs, které potlačovalo  $\gamma/\delta$  T buňky s nižší efektivitou (Galimberti *et al.*, 2009).

#### **4.2.1.1 Th 1 a Th2 populace**

Pro všechny publikace věnující se vztahu MSCs s Th1 a Th2 populacemi je typické, že uvádějí nejednoznačný vliv MSCs na Th1/Th2 populace. Aplikace MSCs má vždy za následek spíše obnovení rovnováhy mezi těmito populacemi a návrat homeostázy. V experimentálním modelu zánětu způsobeném alergickou reakcí byla ukázána schopnost MSCs potlačovat Th2 lymfocyty aktivované alergenem. Zároveň jsou MSCs schopny indukovat T<sub>reg</sub> lymfocyty a jejich prostřednictvím navodit alergen-specifickou toleranci (Kavanagh and Mahon, 2011).

Mimo alergické prostředí jsou MSCs schopny potlačovat expanzi Th2 buněk také v modelu autoimunitního onemocnění, jak ukázali Zhou *et al.* Po aplikaci MSCs došlo ke zlepšení projevů onemocnění u MRL/lrp myši, které jsou používány jako model pro Lupus erythematosus a Sjögrenův syndrom. Zlepšení bylo pozorováno v souvislosti s potlačením expandované Th2. Zároveň byl pozorován posun v bilanci Th1/Th2 směrem k Th1 a pokles v produkci autoprotilátek B lymfocyty (Zhou *et al.*, 2008). Zároveň s tím dochází v modelu lupusu k poklesu produkce IL-4 typického pro Th2 populaci za současného nárůstu produkce IFN $\gamma$ , typického pro Th1 populaci. Mimo upravení rovnováhy Th1/Th2 byl pozorován také značný nárůst v produkci TGF- $\beta$ , souvisejícího s Treg populací, což značí zlepšení celkového průběhu nemoci (Sun *et al.*, 2010). Naproti tomu byla na experimentálním modelu diabetu 1. typu ukázána schopnost MSCs navodit zlepšení průběhu onemocnění prostřednictvím zvýšení produkce Th2 cytokinů, jako je IL-4 a zároveň navrácení rovnováhy Th1/Th2 (Fiorina *et al.*, 2009; Ezquer *et al.*, 2012). Stejně výsledky byly pozorovány v případě alogenní transplantace ledvin, kdy byla vlivem MSCs polarizována cytokinová odpověď směrem k Th2 (Ge *et al.*, 2010). Schopnost udržovat rovnováhu mezi Th1/Th2 populacemi nemají jen MSCs. Bylo dokázáno, že použití kondicionovaného média získaného z kultivace MSCs je dostačující pro navrácení rovnováhy Th1/Th2 v krysím modelu astmatu (Keyhanmanesh *et al.*, 2018).

#### 4.2.1.2 Th17 a T<sub>reg</sub> populace

Důležitým mechanismem, který ovlivňuje prostředí organismu po aplikaci MSCs je také jejich schopnost inhibovat diferenciaci a funkčnost Th17 populace T lymfocytů. Látkami podílejícími se na této funkci jsou PGE<sub>2</sub> a IDO, produkované MSCs (Tatara *et al.*, 2011). Přesmyk naivních T buněk na Th17 populaci je tlumen solubilními faktory závislými na COX-2 (cyclooxygenase 2, cyklooxygenáza 2), které jsou produkovány MSCs po kontaktu s aktivovanými T lymfocyty. Důležitou roli zde hraje molekula PGE<sub>2</sub>, produkovaná MSCs, která se váže na receptor EP4 (prostaglandin E2 receptor 4) přítomný na Th17 lymfocytech. Vlivem těchto mechanismů dochází ke snížení produkce prozánětlivého IL-17 (McCarthy *et al.*, 2011). Pokles Th17 populace je pozorován i v případě revmatoidní artritidy, kde současně s regulací velikosti populace Th17 dochází vlivem MSCs ke snížení produkce cytokinů IL-17, IL-21, IFN $\gamma$  a TNF $\alpha$  a nárůstu produkce TGF- $\beta$  (Vasilev *et al.*, 2019).

Kromě potlačení vývoje Th17 jsou MSCs schopny také snižovat jejich funkci. Pro produkci IL-17 je důležitá funkčnost transkripčního faktoru STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3, aktivátor transkripce 3). Ten se váže na promotor IL-17 a pozitivně tím ovlivňuje jeho produkci. MSCs mají schopnost produkovat až 4 varianty chemokinu CCL (chemokine C-C motif ligand, ligand chemokinu struktury C-C) 2, který působí antagonisticky proti STAT3, čímž inhibuje aktivitu Th17 lymfocytů (Rafei *et al.*, 2009). Po buněčném kontaktu MSCs s Th17 lymfocyty, prostřednictvím CCL20

na MSCs a jeho receptorem CCR6 na Th17 lymfocytech, může navíc dojít k nárůstu produkce IL-10 a indukci transkripčního faktoru FoxP3 (forkhead box protein 3). Tento efekt může nastat pouze v přítomnosti PGE<sub>2</sub>. Následkem toho může dojít k přesmyku Th17 lymfocytů na T<sub>reg</sub> lymfocyty (Ghannam *et al.*, 2013). MSCs mají také schopnost stimulovat nediferencované T lymfocyty k produkci IL-10 a TGF-β. Produkce zmíněných faktorů vede k vývoji regulačních T<sub>reg</sub> lymfocytů (Prevosto *et al.*, 2007). Současně s potlačením Th17 populace jsou MSCs schopny podporovat populaci T<sub>reg</sub>, pomáhají udržet vysokou hladinu exprese transkripčního faktoru FoxP3 a snižují expresi CD127, což zajišťuje dlouhodobé udržení T<sub>reg</sub> a jejich regulačních vlastností (Di Ianni *et al.*, 2008). V případě alogenní transplantace ledviny dochází pod vlivemIDO produkovaného MSCs, k nárůstu populace T<sub>reg</sub> lymfocytů a snížení reakce na transplantát (Ge *et al.*, 2010). Kromě funkce během transplantace orgánů byly pozorovány podobné výsledky i v případě poranění plic. V experimentálním modelu zánětu plic vyvolaného aplikací LPS bylo po intravenózním podání MSCs pozorováno snížení zánětu, manifestované poklesem aktivity migrujících buněk, poklesem prozánětlivých cytokinů a snížení vaskulární permeability. Současně bylo pozorováno potlačení populace Th17 a procentuální nárůst populace T<sub>reg</sub> a s ní souvisejícího cytokinu IL-10 (Wang *et al.*, 2019).

Práce Normanton *et al.* ukázala na schopnost MSCs inhibovat apoptózu T lymfocytů produkcí IL-7. Současně s inhibicí apoptózy byla pozorována schopnost MSCs zvyšovat podíl T<sub>reg</sub> lymfocytů na úkor Th17 lymfocytů (Normanton *et al.*, 2014). Antiapoptotické vlastnosti MSCs byly pozorovány také jinou skupinou, která ukázala na nutnost buněčného kontaktu mezi MSCs a splenocyty (Spl). Samotný buněčný kontakt ovšem není pro inhibici apoptózy dostačující, důležitou roli hraje také produkce IL-6 MSCs (Xu *et al.*, 2007).

#### 4.2.1.3 CD8<sup>+</sup> T lymfocyty

MSCs jsou z velké části odolné vůči lýze cytotoxickými T lymfocyty, jejichž efekt inhibují pomocí rozpustných faktorů. Současně jsou MSCs schopny inhibovat vývoj cytotoxických T lymfocytů, tato jejich schopnost je ovšem závislá na čase podání a dávce buněk. Naproti tomu na již aktivované efektorové cytotoxické T lymfocyty nemají žádný vliv (Rasmusson *et al.*, 2003).

MSCs mají schopnost snižovat expresi CD8 na cytotoxických T lymfocytech a zároveň s tím snižují expresi aktivačních markerů. Nejvýraznější rozdíl byl zaznamenán v případě CD28, CD44 a CD95. Tato jejich funkce úzce souvisí s CD14<sup>+</sup> monocyty, na které působí prostřednictvím solubilních molekul. Takto indukované monocyty poté přímým buněčným kontaktem působí na CD8<sup>+</sup> lymfocyty, snižují jejich aktivitu a indukují regulační fenotyp (Hof-Nahor *et al.*, 2012). Studie Li *et al.* ukázala na schopnost MSCs potlačovat CD8<sup>+</sup> cytotoxické T lymfocyty a jejich produkci IL-2 a IFNγ. Tento efekt je zprostředkován jak solubilními faktory, jako je PGE<sub>2</sub>, IDO, TGF-β, tak prostřednictvím přímého

buněčného kontaktu pomocí MIC (MHC class I polypeptide-related sequence) -A a MIC-B, jejichž vlivem snižují expresi NKG2D (NK cell receptor D, receptor NK buněk D) na CD8<sup>+</sup> lymfocytech (Li *et al.*, 2014).

#### **4.2.2 Vliv MSCs na ostatní buňky imunitního systému**

##### **4.2.2.1 B buňky**

Kromě T lymfocytů mají MSCs vliv také na B lymfocyty. V experimentálním modelu kolitidy bylo pozorováno zlepšení průběhu onemocnění po aplikaci MSCs, které modulovaly nerovnováhu Th1/Th17/T<sub>reg</sub> směrem k navýšení počtu T<sub>reg</sub> buněk. Mimo to byl pozorován nárůst CD5<sup>+</sup> B lymfocytů a B<sub>reg</sub> lymfocytů, které produkovaly IL-10 (Chao *et al.*, 2016). Velmi podobných výsledků bylo dosaženo také ve steroid-resistantním GvHD. Zde po aplikaci MSCs došlo ke zlepšení stavu pacienta, to bylo vyvoláno navýšením populace CD5<sup>+</sup> B lymfocytů, které byly schopné produkovat IL-10 (Y Peng *et al.*, 2015). Zmíněný nárůst populace B lymfocytů může být způsoben produkcí BAFF (B cell activating factor, faktor aktivující B buňky), který jsou MSCs schopny produkovat po odpovídající stimulaci. Pomocí stimulace TLR-4, který se přirozeně vyskytuje na povrchu MSCs, bylo možno pozorovat expresi BAFF, která byla regulována prostřednictvím NFκB (nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells, jaderný faktor kappa B) signalizační dráhy (Yan *et al.*, 2014).

Naproti tomu bylo v experimentálním myším modelu lupusu pozorováno potlačení aktivace B lymfocytů a zlepšení nefritidy. Po aplikaci MSCs docházelo ke snížení maturace a diferenciaci B lymfocytů společně s potlačením jejich aktivace. Výsledky dokládají schopnost MSCs potlačit expresi BAFF a jeho receptorů (Ma *et al.*, 2013). V *in vitro* experimentech se také ukázala schopnost MSCs potlačovat terminální diferenciaci B lymfocytů, současně bylo v supernatantu pozorováno snížené množství Ig (imunoglobulin) M. Stejný efekt byl poté pozorován i v *in vivo* modelu, kde myši, jimž bylo podáno kondicionované médium pocházející od MSCs, kdy tyto buňky vykazovaly sníženou sekreci IgM a IgG1 (Asari *et al.*, 2009). Pro úspěšnou modulaci B buněčné odpovědi jsou velmi důležité T lymfocyty. Jak bylo ukázáno, samotné MSCs nejsou schopné spolehlivě modulovat B buněčné imunitní reakce. Kritickou roli hraje buněčný kontakt MSCs a T lymfocytů, kdy dochází k produkci solubilních faktorů, kterými jsou ovlivněny B lymfocyty a samotný buněčný kontakt s nimi tak již není vyžadován (Rosado *et al.*, 2014). Souhrnně tyto výsledky opět ukazují na schopnost MSCs obnovovat homeostázu.

##### **4.2.2.2 Buňky vrozeného imunitního systému**

Kromě vlivu na T a B lymfocyty působí MSCs i na ostatní buňky imunitního systému. Práce English *et al.* například ukázala schopnost MSCs potlačovat funkčnost dendritických buněk (DC). MSCs byly při kokultivaci s DC schopné potlačit maturaci těchto buněk, snižují expresi MHC-II a CD86.



Popsané změny mají za následek snížení schopnosti dendritických buněk prezentovat antigen. Zároveň byla potlačena schopnost dendritických buněk migrovat pod vlivem CCL19. To je způsobeno dočasně sníženou expresí chemokinového receptoru CCR7 (English, Barry and Mahon, 2008). Dále byla ukázána schopnost MSCs blokovat vstup monocytů do G<sub>1</sub> fáze a jejich diferenciaci na DC (Ramasamy *et al.*, 2007). V jiné studii byl potvrzen inhibiční vliv MSCs na dendritické buňky, které nebyly vlivem produkce IL-10 a buněčného kontaktu schopny dokončit svůj vývoj z monocytů. Současně s tímto nálezem bylo ukázáno, že MSCs mění funkci DC a indukují u nich zvýšenou schopnost fagocytózy a inhibují jejich schopnost aktivovat lymfocyty společně se změnou jejich fenotypu směrem k regulačním dendritickým buňkám produkujícím IL-10 (Gao *et al.*, 2017). Současně MSCs měnily profil cytokinů produkovaných DC, kdy došlo ke snížení produkce GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, faktor stimulující kolonie makrofágů a granulocytů), CXCL1, CCL-5, IL-8, IL-6, CCL-2, CCL-7 a CCL-8 (Park *et al.*, 2015). MSCs také potlačují vývoj a funkci dendritických buněk, a to jak CD34<sup>+</sup> generovaných tak těch z monocytů. V obou případech se na inhibici podílí především solubilní faktory IL-6 a M-CSF (Nauta *et al.*, 2006).

MSCs mají schopnost do určité míry odolávat lýze NK buňkami, navzdory tomu, že jsou těmito buňkami rozpoznávány. Přes svou vlastní odolnost proti NK buňkám nejsou schopny zabránit lýze ostatních buněčných typů, která je zprostředkována NK buňkami (Rasmusson *et al.*, 2003). Zároveň jsou MSCs zabraňují proliferaci neaktivních NK buněk indukovanou IL-2, ovšem na proliferaci již aktivních buněk mají jen malý vliv. NK buňky mohou také lyzovat MSCs ovšem schopnost NK buněk lyzovat MSCs je po indukci MSCs pomocí IFN $\gamma$  významně snížena, protože jeho vlivem dojde k navýšení exprese MHC I na MSCs (Spaggiari *et al.*, 2006).

MSCs mají také efekt na polarizaci makrofágů. V případě aplikace MSCs je silná tendence změny fenotypu makrofágů z M1 na M2. Makrofágy, které přišly do styku s MSCs exprimují více CD206 a vykazují sníženou produkci IL-12 a TNF- $\alpha$  a současně mají zvýšenu svou fagocytickou aktivitu (Kim and Hematti, 2009). Tato změna je doprovázena poklesem v produkci cytokinů typických pro M1 populaci jako je IL-1 $\beta$ , IL-6 a MCP-1 naopak dochází k nárůstu v produkci IL-10. Současně dochází během zpracování L-argininu k upřednostňování enzymu Arg1 (arginase coding gene 1, arginázu kódující gen 1), který je typický pro M2 makrofágy (Cho *et al.*, 2014).

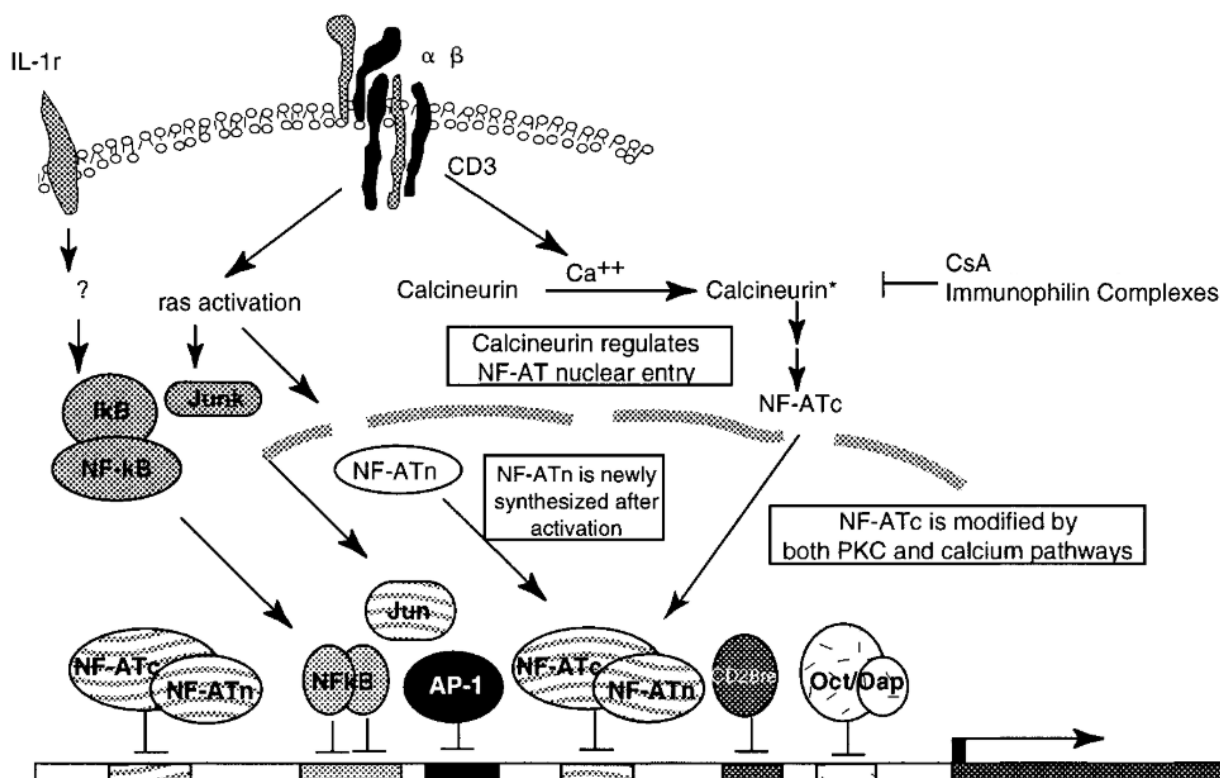
### 4.3 MSCs a jejich terapeutické využití

Pro svoje vlastnosti byly MSCs vybrány jako vhodná forma experimentální terapie některých onemocnění. Mezi prvními klinickými testy, které používaly MSCs jako terapii urychlující regeneraci byla například jejich transplantace pacientům po chemoterapii, kde podporovaly krvetvorbu (Gerson *et al.*, 2000). V případě akutního steroid-resistentního GvHD je po transplantaci MSCs možno pozorovat

zlepšení (Ringdén *et al.*, 2006; Y. Peng *et al.*, 2015; Česen Mazič *et al.*, 2018). Aplikace MSCs podporuje obnovu lymfocytů po transplantaci hematopoetických buněk a snižují riziko selhání štěpu. Současně nebyly pozorovány žádné negativní efekty a terapie byla prohlášena za bezpečnou (Ball *et al.*, 2007). Zároveň není problém použít buňky od jiného dárce, které jsou i přes svůj odlišný původ stále schopny podporovat štěp hematopoetických kmenových buněk a potlačovat nežádoucí reakce T lymfocytů proti štěpu (Maitra *et al.*, 2004). Dalším možným využitím je jejich transplantace pacientům trpícím autoimunitními onemocněními, kde je jejich efekt taktéž pozitivní. V současnosti probíhá téměř 300 klinických studií využívajících MSCs jako formu terapie. Tyto testy pokrývají široké spektrum diagnóz, od podpory regenerace po nejruznějších poraněních, přes léčbu autoimunitně zprostředkovaných orgánových dysfunkcí a podporu regenerace po transplantacích až po regenerativní doplňkovou terapii pro pacienty, kterým byl odstraněn nádor (zdroj [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov)).

#### 4.4 Cyklosporin A

Cyklosporin A (CsA) je látka s imunosupresivními vlastnostmi, která byla poprvé izolována před více než 40 lety z houby *Hypocladium* (Borel *et al.*, 1994). Existuje ve třech formách určených pro různé způsoby podání, jedná se o orální, intramuskulární a intravenózní (Britton and Palacios, 1982). Patří mezi látky souhrnně označovány jako imunophilinové ligandy. Své funkce dosahuje CsA prostřednictvím vazby na cyklofilin, jehož prostřednictvím blokuje fosfatázovou aktivitu kalcineurinu. Zablokování kalcineurinu má za následek kompletní inaktivaci transkripčního faktoru NF-AT (nuclear factor of activated T cells, jaderný faktor aktivovaných T lymfocytů), který řídí celou řadu genů souvisejících s aktivací T lymfocytů, jedná se například o gen pro IL-2, IL-4 a CD-40L. Kromě tohoto mechanismu je CsA schopen také blokovat transkripční faktory AP-3 (adaptor protein complex 3, komplex adaptorových proteinů 3) a Oct-1 (octamer-binding transcription factor 1, oktamer vázající transkripční faktor 1) a také signální dráhu JNK/p38 (c-Jun N-terminal kinase, c-Jun N-terminální kináza/mitogen activated protein kinase, mitogenem aktivovaná protein kináza) (schéma působení viz. obrázek 5) (Schreiber, 1991; Schreiber and Crabtree, 1992; Tedesco and Haragsim, 2012). Kromě žádoucích účinků imunosuprese sebou nese použití CsA také celou řadu negativních vedlejších účinků. Jedná se především o poškození a snížení funkce ledvin, zvýšení krevního tlaku nebo zvýšenou náchylnost k tvorbě nádorů (Webster *et al.*, 2005). Mimo to se při léčbě CsA objevuje také snížený počet T lymfocytů (Jenkins, Schwartz and Pardoll, 1988; Hijnen *et al.*, 2009). I přesto je CsA v současnosti hojně užívaným terapeutikem při léčbě související s transplantacemi orgánů a autoimunitními onemocněními (Starzl *et al.*, 2010; Tedesco and Haragsim, 2012).



**Obrázek 5 – Schéma působení CsA** – CsA působí na transkripční faktor NF-AT pomocí inhibice calcineurinu, tím dojde k inaktivaci NF-AT, což má za následek potlačení transkripce celé řady genů, které hrají důležitou roli během aktivace T lymfocytů. Tím dochází k tlumení funkce T lymfocytů, IL-1r (interleukin 1 receptor), CD3 (cluster of differentiation 3), CsA (cyklosporin A), ras (rat sarcoma protein, protein kryšho sarkomu), NFκB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, jaderný faktor lehkého řetězce kappa aktivovaných B buněk), IκB (inhibitor of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, inhibitor NFκB), NF-AT (nuclear factor of activated T cells, jaderný faktor aktivovaných T buněk), PKC (protein kinase c, protein kináza c), AP-1 Activator protein 1, aktivátorový protein 1), CD28re (cluster of differentiation 28 response element), Oct (octamere binding transcription factor, oktamer vázající transkripční faktor), Dap (death associated protein 1, protein asociovaný s buněčnou smrtí 1), převzato a upraveno podle (Schreiber and Crabtree, 1992)

## 4.5 MSCs v kombinaci s imunosupresivní terapií

Přestože se vztahu imunosupresivní terapie a MSCs věnuje jen malý zlomek publikovaných prací jsou i na tomto poli známy výsledky. Je dokázáno, že nízké dávky imunosupresivní terapie nemají žádný nežádoucí vliv na MSCs (Hoogduijn *et al.*, 2008; Pischitta *et al.*, 2014; Girdlestone *et al.*, 2015; Tsuji *et al.*, 2015). Naopak imunosupresivní léčiva mají často podpurný efekt na MSCs, jak bylo ukázáno například při kultivaci MSCs s CsA, kdy MSCs vykazovaly zvýšenou funkčnost a byla u nich potlačena apoptóza (Chen *et al.*, 2008). Dále měl CsA schopnost u MSCs navodit zvýšenou produkci PD-L2 (Qu *et al.*, 2018). Kromě toho bylo ukázáno, že některé druhy imunosupresivní terapie působí synergisticky s MSCs a navzájem amplifikují svou odpověď, jako například rapamycin (Togha *et al.*, 2017). Objevuje se také potlačení produkce prozánětlivých cytokinů (Zhang, Qin and Zhou, 2007). V jiných případech je kombinovaná terapie schopná dosáhnout nových efektů. Tak je tomu například u aplikace MSCs a mikofenolátu mofetilu, kdy je tato kombinace schopna zabránit infiltraci alogenního štěpu T buňkami a inhibovat antigen prezentující buňky (Eggenhofer, 2010).

Naše laboratoř se problematice podávání MSCs souběžně s imunosupresivní terapií věnuje již řadu let, z tohoto pohledu navazuje moje práce na publikované výsledky. Jedná se především o návaznost na práci dokumentující potlačení nežádoucích efektů imunosupresiv vlivem MSCs a jejich vliv na rovnováhu mezi jednotlivými populacemi T lymfocytů (Hajkova, *et al.*, 2017a). A také návaznost na práci zabývající se lokální aplikací MSCs a CsA pomocí nanovláčeného nosiče (Hajkova, *et al.*, 2017b). Moje práce pak měla za jeden z vedlejších cílů ověřit, zda jsou poznatky získané z *in vitro* podmínek a při lokální aplikaci MSCs uplatnitelné také při systémovém podání.

#### 4.6 Bezpečnost terapie pomocí MSCs a její budoucnost

Stejně jako při jiných buněčných terapiích vyvstává i při použití MSCs otázka o bezpečnosti této terapie. Jako většina léčebných přístupů, nese s sebou i aplikace MSCs riziko vedlejších efektů. Některé publikované výsledky hovoří o schopnosti MSCs podporovat tvorbu nádorů. To je umožněno především podporou T<sub>reg</sub> lymfocytů a produkcí růstových faktorů, jako je například TGF- $\beta$  (Patel *et al.*, 2010). Případně o podpoře metastatické aktivity nádoru celkovým utlumením imunitního systému (Gazdic *et al.*, 2017). Těchto publikovaných výsledků je ovšem jen malé množství, většina prací hovoří naopak o bezpečnosti terapie pomocí MSCs. Jedná se například o publikaci ukazující na schopnost MSCs inhibovat chemicky indukovanou tvorbu nádoru (Nasuno *et al.*, 2014) nebo o publikace vycházející z klinických testů, kdy byly MSCs podávány jako terapie při orgánových transplantacích (Perico *et al.*, 2011, 2018).

V posledních několika letech se výzkum MSCs zaměřuje také na produkty těchto buněk a možnost jejich využití. Často jsou zmiňovány například extracelulární váčky. Ty fungují podobně jako buňky samotné, ale přináší snížená rizika ve srovnání s použitím živých MSCs (Di Trapani *et al.*, 2016). Možnosti použití extracelulárních váček byly ověřeny také v experimentálních *in vivo* modelech (Shigemoto-Kuroda *et al.*, 2017; Bier *et al.*, 2018). Dalším možným postupem je využití kondicionovaného média, které poskytuje podobné výsledky, jako použití MSCs. Efekt kondicionovaného média byl testován *in vitro* (Tafti *et al.*, 2018). Zároveň byly provedeny i *in vivo* studie na modelech rozdílných onemocnění, kde kondicionované médium zlepšovalo celkový stav organismu (Kay *et al.*, 2017; Keyhanmanesh *et al.*, 2018).

## **5 Metody a materiál**

### **5.1 Zvířata**

Na experimenty byli použiti jedinci obou pohlaví myšiho kmene BALB/c a C57BL/6 (B6). Zvířata ve věku 8-12 týdnů byla získána z chovu Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky (ÚMG AV ČR)

### **5.2 Média a roztoky**

Na izolaci a kultivaci MSCs bylo použito DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium, PAA Laboratories, Pasching, Austria). Médium bylo obohaceno přidáním 10 % fetálního telecího séra (fetal calf serum, FCS, Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA – dále jen Sigma), antibiotiky – 100 mg/ml Streptomycinu (Sigma), 100 U/ml Penicilinu (Sigma) a 10 mM Hepes (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) pufru (Sigma).

Pro izolaci a kultivaci Spl bylo využito RPMI (Roswell Memorial Park Institute 1640 medium, Sigma). Médium bylo obohaceno přidáním 10 % FCS, antibiotiky – 100 mg/ml Streptomycinu, 100 U/ml Penicilinu a 10 mM Hepes pufrů a  $5 \times 10^{-5}$  M 2-mercaptoethanolu (Sigma).

Během pasáže buněk, cytometrické analýzy a v případě injekce kontrolních skupin byl použit 1x PBS (phosphate buffer solution, roztok fosfátového pufru) a DMSO (Sigma).

### **5.3 Technické vybavení**

Průtokový cytometr LSR II (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)

Centrifuga Hettich Universal 32R (DJB Labcare, Buckinghamshire, England)

Centrifuga 5430 (Eppendorf, Hamburg, Germany)

Laminární box CleanAir (Schoeller Instruments s.r.o., Praha, Česká republika)

Minicentrifuga MiniSpin (Eppendorf)

CO<sub>2</sub> inkubátor (Sanyo, Osaka, Japan)

Fluorescenční a optický mikroskop Leica DMI8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)

Spektrofotometr OpsysMR (Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA)

Scintilační detektor PerkinElmer Liquid Scintillation Analyzer TRI-CARB 29 10-TR (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)

## 5.4 Software

Software pro ovládání průtokového cytometru FACSDiva Software (Becton, Dickinson)

Software pro vyhodnocování cytometrických dat GateLogic 400.2A (Invai, Mentone, Australia)

Software pro statistickou analýzu GraphPad Prism6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)

Software pro práci se spektrofotometrem Revelation Quicklink (Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA)

Software pro ovládání scintilačního detektoru QuantaSmart<sup>TM</sup> Spectraview (PerkinElmer)

## 5.5 Myší model transplantace

Pro potřeby této práce byl navržen experimentální transplantační *in vivo* model, umožňující studium rozdílů mezi odlišnými terapeutickými přístupy. Model byl založen na myších jedincích kmene BALB/c, kterým byly injikovány Spl izolované z kmene B6, které sloužily jako zdroj aloantigenu. Po provedené transplantaci Spl byli jednotliví jedinci rozděleni do skupin, kterým byla aplikována rozdílná terapie.

Skupin bylo celkem pět, první skupinu tvořili jedinci, kteří sloužili jako kontrola, která sdílela stejné akvárium. Druhé skupině byla provedena transplantace Spl (subkutánně v dorzální oblasti zad,  $10 \times 10^6$  buněk, 50  $\mu$ l) a poté byla skupina ponechána bez zásahu. Třetí skupině byla provedena transplantace Spl a jako terapie byl podáván imunosupresivní lék CsA (Sigma), aplikovaný intraperitoneálně v množství 2 mg/kg. Čtvrtá skupina byla po provedení transplantace Spl léčena pomocí MSCs (intravenózně – ocasní žíla,  $1 \times 10^6$  buněk, 200  $\mu$ l), které byly aplikovány po 4 hodinách od transplantace Spl. K injekci byly používány buňky, které byly předem převedeny z kultivačního média do PBS. V případě myší, kterým nebyly aplikovány MSCs byl injikován čistý PBS (200  $\mu$ l), aby se zajistily stejné podmínky. Poslední skupina byla po transplantaci léčena kombinovanou terapií, CsA a MSCs. Pro kontrolu bylo všem skupinám, kterým nebyl aplikován CsA, aplikováno DMSO (5 ng/ml), ve kterém byl u ostatních skupin CsA rozpuštěn.

Po 96 hodinách od transplantace byly izolovány buňky sleziny a provedena analýza, která zahrnovala měření intracelulárních cytokinů a transkripčních faktorů pomocí průtokové cytometrie a kultivace části vzorku v kultivačních vícejamkových destičkách (Nunc, Roskilde, Denmark) pro pozdější využití v *in vitro* části mé práce.

## 5.6 Izolace a kultivace MSC

Pro potřeby této práce byly MSC získávány z tukové tkáně jedinců myšího kmene BALB/c. Tuková tkáň byla odebírána z abdominálního tříselného tukového ložiska, ze kterého byla nejprve odstraněna

mízní uzlina a tuková tkáň byla homogenizována. K homogenizované tukové tkáni byl přidán 10 % roztok kolagenázy I (Sigma). Vzniklá směs byla 60 minut inkubována při 37 °C, v průběhu inkubace byla směs promíchána. Směs byla přenesena do zkumavky a doředěna PBS na 8 ml. Zkumavka byla poté centrifugována (4 minuty, 25 °C, 170 RCF). Po centrifugaci byla peleta přenesena do nové zkumavky, kde byla doředěna pomocí PBS do 8 ml a centrifugována (4 minuty, 25 °C, 170 RCF). Tento postup byl 3krát opakován. Peleta byla resuspendována v DMEM a přenesena do kultivačních lahví, po 48 hodinách byly buňky opláchnuty pomocí předem temperovaného média, aby došlo k odmytí neadherentních buněk. Buňkám bylo poté dodáno nové médium a byly kultivovány v inkubátoru při 37 °C po dobu 3 týdnů. Buňky byly během kultivace pasážovány při dosažení konfluence. Maximální počet pasáží nepřekročil 4, takto kultivované buňky byly následně použity k experimentům.

## 5.7 Izolace a kultivace splenocytů

Spl byly izolovány ze slezin jedinců kmene BALB/c a B6. Slezina byla mechanicky homogenizována. Vzniklá suspenze byla přenesena do zkumavky a centrifugována (8 min, 8 °C, 170 RCF), supernatant odlit a peleta byla resuspendována v požadovaném roztoku, pro potřeby aplikace buněk se jednalo o PBS, v případě další kultivace se jednalo o RPMI. Buňky byly kultivovány v inkubátoru při teplotě 37 °C s 5 % CO<sub>2</sub> (carbon dioxide, oxid uhličitý) atmosférou v kultivačních destičkách (Nunc).

Pro stimulaci buněk antigenem B6 byly pro *in vitro* experimenty používány chemicky inaktivované buňky. Inaktivace byla prováděna pomocí roztoku mitomycinu c (25 µl/ml, 10x10<sup>6</sup> buněk v 500 µl média, Sigma). Suspenze byla na dobu 30 minut inkubována při 37 °C, následně byla 2krát promyta a centrifugována (8 min, 8 °C, 170 RCF). Konečným krokem bylo odlití média a resuspendování pelety v RPMI na požadovanou koncentraci buněk. Bylo potvrzeno, že takto inaktivované buňky neproliferují, ani neprodukují cytokiny.

## 5.8 Kultivační testy

V rámci své práce jsem se zabýval také sekundární odpovědí Spl myší, kterým byla provedena transplantace. Spl byly kultivovány v kultivačních destičkách společně s inaktivovanými Spl kmene B6. Tyto pokusy měly za účel odhalit změny v odpovědi buněk imunitního systému na sekundární setkání s antigenem, případně po nespecifické stimulaci pomocí konkanavalinu A (ConA, Sigma).

Pro potřeby měření intracelulárních cytokinů pomocí průtokové cytometrie byly Spl kultivovány ve 24 jamkové kultivační destičce v počtu 1,5x10<sup>6</sup> buněk na 1,2 ml média v poměru 1:1 s inaktivovanými B6 Spl nebo ConA (1,25 µg/ml) a to po dobu 24 respektive 72 a 96 hodin. Z těchto destiček byl také odebrán supernatant pro ELISA (enzyme-linked immuno-sorbent assay).

Buňky byly před měřením kultivované po dobu 4 hodin s PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate, koncentrace 50 ng/ml, Sigma), Ionomycinem (500 ng/ml, Sigma) a Brefeldinem A (koncentrace 5 ng/ml, eBioscience, San Diego, CA, USA).

## 5.9 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie byla používána pro detekci povrchových znaků, intracelulárních cytokinů a transkripčních faktorů. Vzorky na průtokovou cytometrii byly připravovány jak z orgánů, tak z buněčných kultur.

Celý proces přípravy vzorků byl prováděn na ledu. Slezina byla odebrána do malého množství média, médium bylo poté odlito a slezina byla mechanicky homogenizována. Vzniklá suspenze byla resuspendována v PBS a přefiltrována do připravené zkumavky, která byla centrifugována (8 °C, 8 min, 170 RCF). Supernatant byl po centrifugaci odlit a peleta byla resuspendována. Suspenze byla poté přenesena do 96 jamkové destičky (SPL Life Sciences, Naechon-Myeon, Korea), 200 µl vzorku na jamku. Destička byla následně centrifugována (3 min, 8 °C, 170 RCF) a peleta rozvolněna pomocí třepačky.

Postup při barvení se odvíjel od zvoleného experimentu. V případě intracelulárního barvení byly nejprve nabarveny povrchové markery. Jejich barvení probíhalo přidáním monoklonální protilátky (mAb, monoclonal antibody) konjugované s barevnými fluorchromy (tab. 3). Fluorchromy používané v mých experimentech byly fluorescein isothyokyanát (FITC, fluorescein isothiocyanate), fykoerytrin (PE, phycoerythrin), allofykocyanin (APC, allophycocyanine) a Alexa Fluor 700 (A700, Alexa Fluor 700). Ke značení mrtvých buněk byla v případě intracelulárního barvení použita Fixable Viability Die eFluor® 450 (eBioscience). V případě barvení pouze povrchových znaků byl použit Hoechst 33258 (Sigma). Vzorové dot ploty lze vidět na obr. 6 a 7.

Pro barvení povrchových znaků byl použit protokol:

- 1) Přidání 10 µl naředěné protilátky proti povrchovým znakům
- 2) Inkubace bez přístupu světla po dobu 30 minut na ledu
- 3) 2x promytí pomocí 200 µl PBS a centrifugace (3 min, 170 RCF, 8 °C)
- 4) Rozvolnění pelety
- 5) Naředění do 200 µl pro měření
- 6) Před měřením přidání Hoechst 33258

Pro barvení intracelulárních cytokinů byl použit protokol:

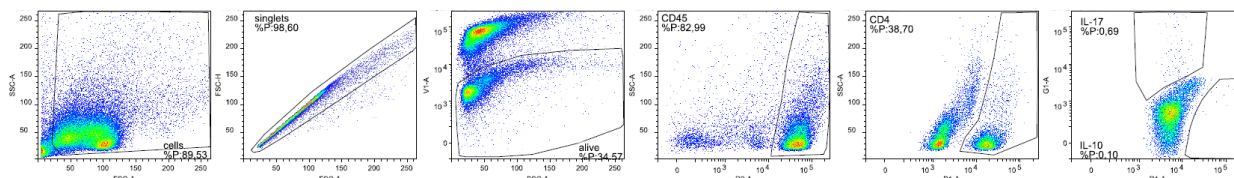
- 1) Barvení povrchových znaků podle výše zmíněného protokolu (kroky 1-5)



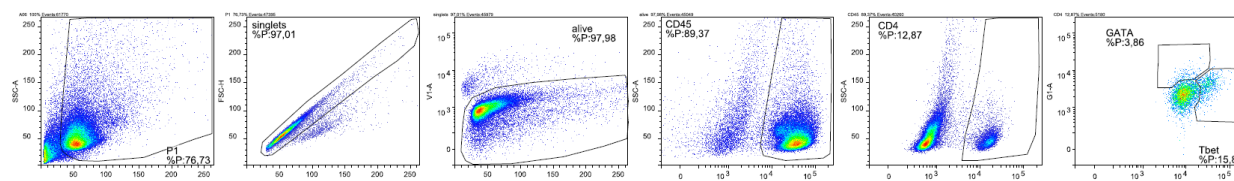
- 2) Fixace buněk pomocí fixačního pufru (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA, 10 min na ledu + 20 minut při pokojové teplotě)
- 3) 2x promytí 200 µl permeabilizačního pufru (Invitrogen™)
- 4) Rozvolnění pelety na třepačce
- 5) Permeabilizace a barvení buněk pomocí 10 µl protilátky naředěné v permeabilizačním pufru (25 min při pokojové teplotě)
- 6) 2x promytí pomocí 200 µl permeabilizačního pufru a centrifugace (4 min, 25 °C, 300 RCF)
- 7) Rozvolnění pelety na třepačce a přidání 200 µl permeabilizačního pufru
- 8) Měření

Pro barvení intracelulárních transkripčních faktorů byl použit protokol:

- 1) Barvení povrchových znaků podle výše zmíněného postupu
- 2) Fixace buněk pomocí fixačně-permeabilizačního pufru (Invitronen™, 30 min, 4 °C)
- 3) Promytí a centrifugace (4 min, 25 °C, 300 RCF)
- 4) Barvení buněk pomocí 10 µl protilátky naředěné v permeabilizačním pufru (Invitrogen™, 25 min, pokojová teplota)
- 5) 2x promytí permeabilizačním pufrem
- 6) Přidání 200 µl permeabilizačního pufru
- 7) Měření



**Obrázek 6 – Vzorové dot ploty aplikované gatovací strategie – intracelulární měření cytokinů pomocí průtokové cytometrie**



**Obrázek 7 – Vzorové dot ploty aplikované gatovací strategie – intracelulární měření transkripčních faktorů pomocí průtokové cytometrie**

**Tabulka 3 – Seznam použitých protilátek na průtokovou cytometrii**

Znak	Fluorochrom	Klon	ředění	výrobce	typ značení
CD45	A700	30-F11	1:250	Biolegend	povrch
CD34	PE	HM34	1:50	Biolegend	povrch
CD44	FITC	IM7	1:50	Biolegend	povrch
CD11b	FITC	M1/70	1:50	Biolegend	povrch
CD90.2	APC	30-H12	1:50	SONY	povrch
CD105	PE	MJ7/18	1:50	Biolegend	povrch
CD73	PE	eBioTY/118	1:50	eBioscience	povrch
CD69	PE	H1.2F3	1:120	Biolegend	povrch
CD25	APC	PC61	1:200	Biolegend	povrch
CD4	PE	GK1.5	1:160	PharMingen	povrch
CD4	APC	GK1.5	1:160	Biolegend	povrch
CD4	FITC	RM4-5	1:160	eBioscience	povrch
CD8	APC	53-6.7	1:160	Biolegend	povrch
IFN $\gamma$	FITC	XM61.2	1:100	eBioscience	intracelulárně
IL-10	PE	JES5-16E3	1:80	eBioscience	intracelulárně
IL-4	APC	11B11	1:80	eBioscience	intracelulárně
IL-17	PE	eBio17B7	1:70	eBioscience	intracelulárně
IL-2	APC	JES6-5H4	1:100	eBioscience	intracelulárně
FoxP3	PE	FJK-16s	1:70	eBioscience	intracelulárně
T-bet	eFluor660	eBio4B10	1:70	eBioscience	intracelulárně
GATA-3	PE	TWAI	1:150	eBioscience	intracelulárně
ROR $\gamma$ t	PE	AFKJS-9	1:80	eBioscience	intracelulárně

Vliv CsA na MSC byl posouzen pomocí exprese typických markerů měřených průtokovou cytometrií. MSCs byly v počtu  $0,2 \times 10^6/3$  ml kompletního DMEM kultivovány v 6 jamkové destičce (Nunc) společně s CsA v koncentraci 5  $\mu\text{g/ml}$ . Po třídenní kultivaci byly fluorescenčně označeny markery typické pro MSC (podle postupu popsaného výše pro povrchové markery) a výsledek cytometrické analýzy porovnán s buňkami kultivovanými v médiu bez cyklosporinu A.

## 5.10 ELISA

Pro měření hladin cytokinů IL-10, IL-4 a IL-17 přítomných v supernatantu byl použit kit DuoSet ELISA Development System (R&D Systems, Minneapolis, NY, USA). Pro měření hladiny IFN $\gamma$  byly použity specifické protilátky ELISA BD Pharmingen (BD Pharmingen, San Diego, MA, USA). V obou případech bylo při práci postupováno dle protokolu přiloženého výrobcem. Pro zpracování vzorků byly použity 96 jamkové destičky Immunoplate (SPL Life Sciences). Měření optické denzity probíhalo na spektrofotometru OpsyssMR, pomocí měřicího filtru 405 nm a referenčního filtru 603 nm, pro IFN $\gamma$ . Pro měření IL-10, IL-4 a IL-17 byl použit měřicí filtr 450 nm a referenční filtr 570 nm. V obou případech se jedná o přímý sendvičový ELISA test, kde je koncentrace cytokinu přímo úměrná optické denzitě.

### 5.11 Jednostranná MLC

Spl získané ze všech skupin myší, byly kultivovány v počtu  $0,2 \times 10^6$  buněk na jamku v přítomnosti  $0,2 \times 10^6$  inaktivovaných B6 Spl v 96 jamkové destičce v objemu 200  $\mu$ l média RPMI. Buňky byly kultivovány po dobu 96 hodin, přičemž 6 hodin před koncem kokultivace byl do každé jamky přidán radioaktivní  $^3\text{H}$ -thymidin (1  $\mu\text{Ci}$ /jamka, PE systems, Waltham, MA, USA). Poté byly buňky lyzovány a přeneseny pomocí harvestoru na dvojitou tkaninu skelného vlákna. Na základě analýzy inkorporace radioaktivně značeného  $^3\text{H}$ -thymidinu byla stanovena proliferace buněk po jejich sekundárním setkání s antigenem.

### 5.12 Diferenciace MSC

Diferenciace byla prováděna na MSCs kultivovaných po dobu 14 dní za standartních podmínek. MSCs byly přeneseny na Petriho misky se skleněným dnem (Invitro Scientific, Melbourne, Australia), které jsou určeny na mikroskopování. Po dosažení konfluentní vrstvy buněk bylo vyměněno kultivační médium za diferenciační médium, které bylo připraveno dle protokolu poskytnutého výrobcem v diferenciačním kitu StemPro differentiation kit (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) pro příslušný typ buněk (chondrocyty, osteocyty). Po uplynutí stanovené doby potřebné k diferenciaci MSCs na daný buněčný typ byly buňky opláchnuty PBS a fixovány pomocí 4 % paraformaldehydu po dobu 20 minut. Paraformaldehyd byl poté odstraněn pomocí deionizované vody a bylo přidáno příslušné barvivo. Osteocyty byly barveny pomocí Alizarin Red S (Sigma) po dobu 3 minut, následně bylo přebytečné barvivo odstraněno pomocí deionizované vody a buňky byly analyzovány. Chondrocyty byly barveny po dobu 30 minut roztokem Alcian Blue (Sigma, B8438, 1 % in 3 % acetic acid). Přebytečný barvicí roztok byl po uplynutí stanoveného času odstraněn pomocí 1 nM HCl (hydrochlorid acid, kyselina chlorovodíková) a destilované vody a buňky analyzovány.

Při diferenciaci adipocytů byly MSCs nasazeny do Petriho misky se skleněným dnem, po dosažení konfluentního nárůstu buněk bylo standartní kultivační médium vyměněno za kompletní DMEM obohacené o diferenciační faktory. Na přípravu 10 ml média bylo použito: 1  $\mu$ l dexamethasonu (1 mM, Sigma), 10  $\mu$ l 3-izobutyl-1-methylxanthinu (0,5 M, firma), 10  $\mu$ l insulinu (10mg/ml, Sigma), 100  $\mu$ l indomethacinu (1 M, Sigma). Diferenciační médium bylo každé 2-3 dny měněno. Po týdnu se objevily tukové kapénky a buňky byly připraveny na analýzu. Médium bylo odebráno a buňky fixovány po dobu 40 minut pomocí 4 % roztoku paraformaldehydu při pokojové teplotě. Paraformaldehyd byl 3krát opláchnut pomocí PBS a 2krát pomocí vody. Následně byly buňky barveny pomocí Red Oil O (Sigma, 0,5g/100ml roztok isopropanolu, roztok isopropanolu v poměru 3:2 s destilovanou vodou) po dobu 50

minut při pokojové teplotě. Poté byla přebytečná barva omyta pomocí vody a buňky analyzovány. Na analýzu všech buněk byl použit mikroskop Leica Dmi8.

### 5.13 Mikroskopie MSCs

Na dno 6 jamkové kultivační destičky bylo umístěno sterilní mikroskopické krycí sklo. Následně byly do jamky přidány MSCs v koncentraci  $0,015 \times 10^6$  buněk/ml ve 3 ml média DMEM v případě kontroly. U druhé Petriho misky byl k médiu přidán CsA ( $5 \mu\text{g/ml}$ ). Buňky byly kultivovány po dobu 3 dní, načež bylo médium odebráno. Buňky byly opláchnuty pomocí PBS a fixovány po dobu 60 minut pomocí 4 % roztoku paraformaldehydu. Následně byly buňky opláchnuty pomocí PBS. Buňky byly poté 3krát po 10 minutách ponechány v 0,2 % roztoku Triton X-100 (Sigma) v PBS, načež následovalo jejich barvení pomocí phalloidinu (konjugován s Alexa Fluor 568, Molecular probes™, Eugene, OR, USA). Barvení roztokem phalloidinu (1:200 v 0,2 % roztoku Triton X-100 v PBS) probíhalo ve tmě po dobu 60 minut při pokojové teplotě. Následně byly buňky 2krát opláchnuty PBS a lehce osušeny. Krycí sklíčko bylo poté vyjmuto a položeno vrchní stranou na kapku Mowiolu (Calbiochem, Billerica, MA, USA) s DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), která byla umístěna na podložním skle. Následovala analýza na fluorescenčním mikroskopu Leica Dmi8.

### 5.14 Migrace MSCs

Pro zjištění vlivu CsA na přežívání a migraci transplantovaných MSCs v organismu byly provedeny experimenty, při kterých byly značené MSCs aplikovány myším. Myši byly rozděleny do tří skupin, jedné skupině byly aplikovány MSCs a druhé skupině byly aplikovány MSCs a CsA a poslední skupina byla kontrolní. Ze všech skupin byly po 96 nebo 168 hodinách odebírány jednotlivé orgány a prováděna analýza. MSCs byly značeny pomocí fluorescenční barvy PKH-26 (PKH-26 Red Fluorescent Cell Linker Kit, Sigma), dle návodu výrobce. Po uplynutí stanoveného času byly myším odebírány orgány: slezina, kůže v místě transplantace alogenních buněk, srdce, plíce, játra, kostní dřeň. Slezina a játra byly homogenizovány pomocí homogenizátoru. Kůže a plíce byly po odebrání nastříhány a štěpeny v 1 % roztoku kolagenázy II (Sigma) při  $37^\circ\text{C}$ , po dobu 40 minut u plic a 90 minut u kůže. V obou případech bylo na posledních 10 minut přidáno 0,05 mg/ml DNázy I (Roche, Mannheim, Germany). Kostní dřeň byla vypláchnuta injekční stříkačkou a homogenizována. Srdce bylo opláchnuto v PBS, nastříháno a přeneseno do zkumavek určených pro přístroj gentleMACS™ (Miltenyi Biotec, Bergish-Gladbach, Germany), bylo přidáno 1,5 ml PBS 1 % liberázy™ (Roche) a 0,05 mg/ml DNázy I. Zkumavky byly umístěny do přístroje na program Hearth 1, následovala 15 min inkubace v  $37^\circ\text{C}$  a program Hearth 2. Enzymy byly inaktivovány přidáním 10 % roztoku BSA (hovězí sérum albumin, bovine serum albumin, Sigma) v PBS, suspenze byla doředěna pomocí PBS a 2x promyta ( $8^\circ\text{C}$ , 170 RCF, 8 min). Všechny suspenze byly přeneseny do destičky na průtokovou cytometrii. Dále bylo postupováno jako při ostatních měřeních průtokovým cytometrem popsaných výše.

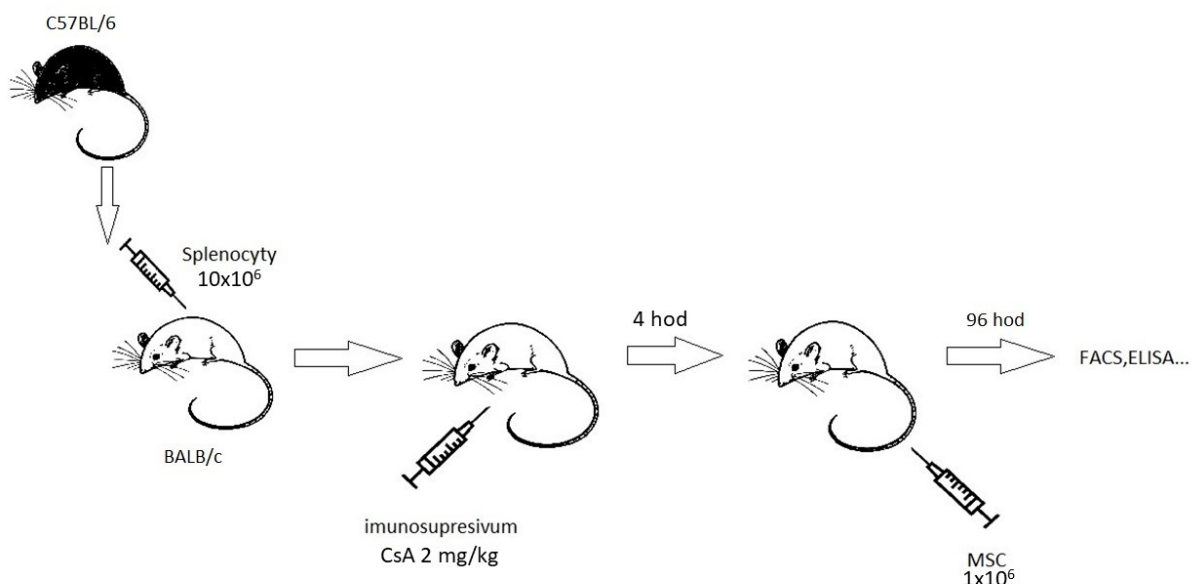
## 5.15 Statistická analýza

Pro statistické posouzení výsledků byl použit software GraphPad v.5, který zpracoval data pomocí statistického testu ANOVA (Analysis of variance – analýza rozptylu). Hodnoty  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$  byly považovány za signifikantní.

## 6 Výsledky

### 6.1 Myší model

Myším kmene BALB/c bylo injikováno  $10 \times 10^6$  Spl získaných z kmene B6, ložisko buněk zůstává kompaktní, což bylo ověřeno vizuálně pomocí binolupy na buňkách značených PKH-26. Čas aplikace MSCs byl vybrán na základě předchozích zkušeností laboratoře (Javorkova *et al.*, 2014). Vhodný den pro odběr tkání byl určen na základě pokusů určujících kinetiku odhojování buněk a reakce imunitního systému. Na základě těchto pokusů byl určen jako nejvhodnější čas pro odběr 96 hodin po transplantaci.

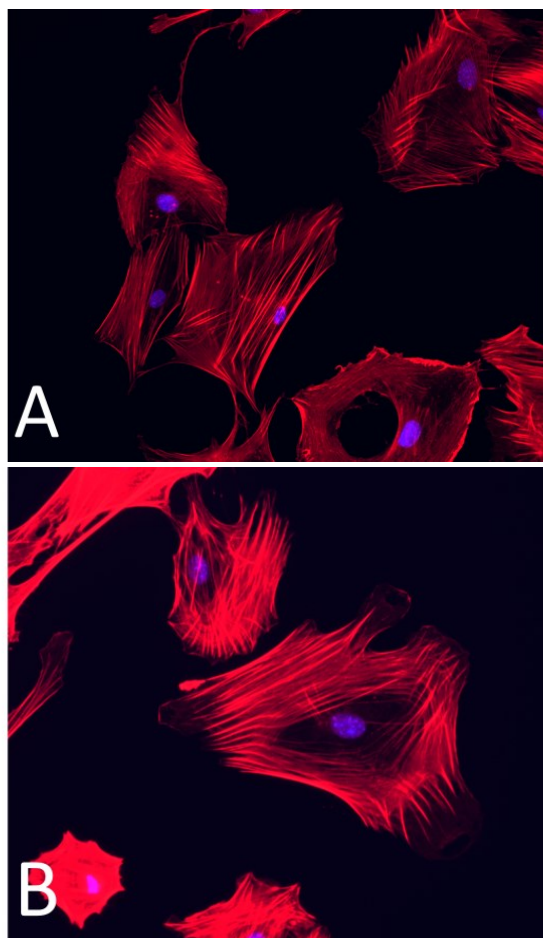


**Obrázek 8 – Stručné schéma *in vivo* pokusu** – izolace B6 Spl, jejich transplantace jedincům BALB/c v koncentraci  $10 \times 10^6$  buněk, podání imunosupresiv (CsA 2 mg/kg), injekce MSCs ( $1 \times 10^6$  buněk), po 96 hodinách příprava vzorků pro analýzu

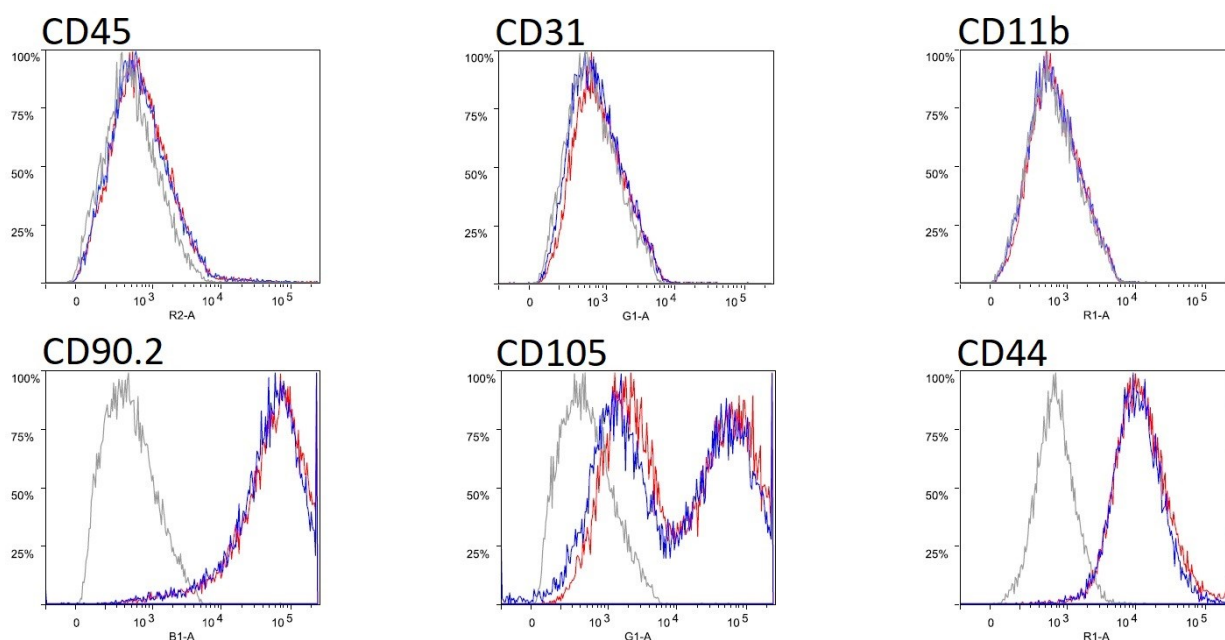
## 6.2 Použité MSCs

MSCs jsou definovány schopností diferencovat do 3 buněčných typů (osteocyty, adipocyty a chondrocyty), adhezí k plastiku, absencí markerů hematopoetické linie, a naopak expresí znaků jako je CD44, CD90.2 a CD105. Pomocí průtokového cytometru byla dokázána absence, respektive přítomnost těchto znaků.

V případě přítomnosti CsA (5  $\mu\text{g/ml}$ ) v kultivačním médiu není ovlivněna morfologická struktura MSC, jak je vidět na obr. 10. Zároveň přítomnost CsA (5  $\mu\text{g/ml}$ ), v kultivačním médiu pro kultivaci MSCs, neovlivňuje expresi, respektive absenci typických znaků, jak je vidět na obr. 11.



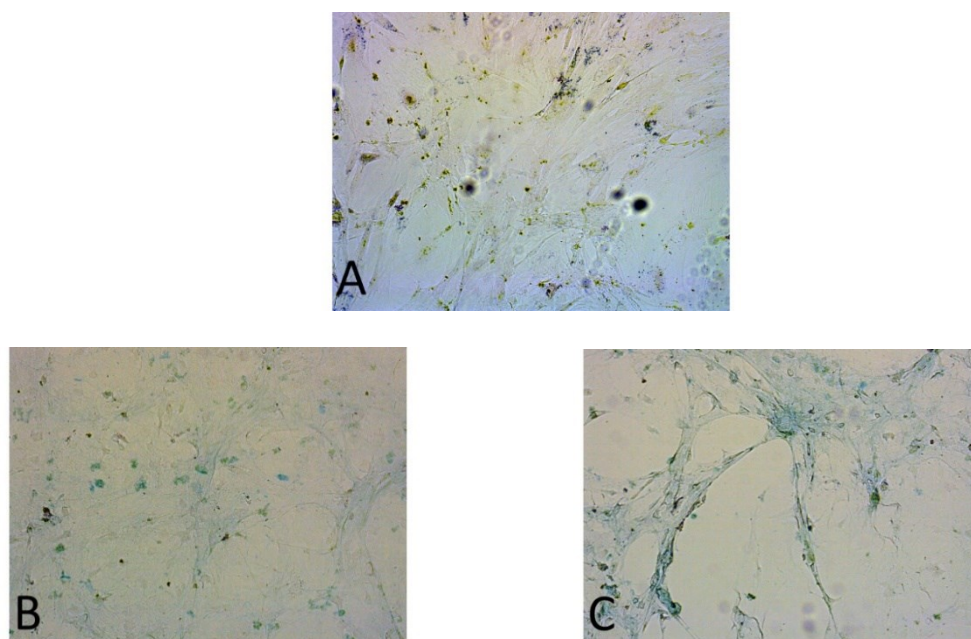
**Obrázek 9 - (A) Kontrolní MSCs pod fluorescenčním mikroskopem, (B) MSCs kultivované s CsA (5  $\mu\text{g/ml}$ ) pod fluorescenčním mikroskopem – barvení jádra pomocí DAPI, barvení cytoskeletu pomocí phalloidinu konjugovaného s Alexa Fluor 568, zvětšení 400x**



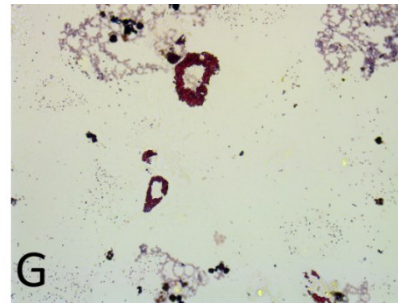
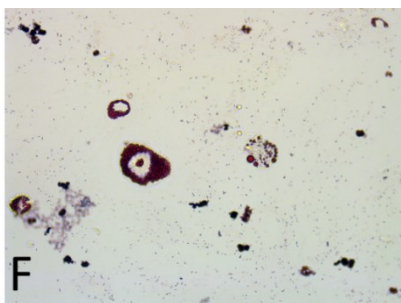
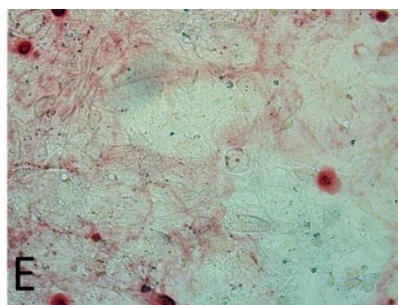
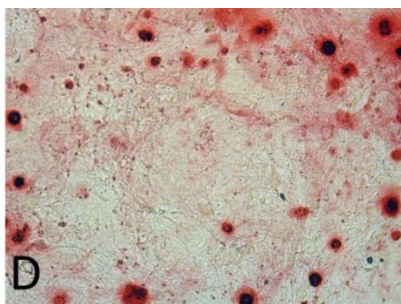
**Obrázek 10 – Fenotypizace MSCs** – měřeno průtokovým cytometrem, absence markerů CD45, CD31, CD11b v horním řadě, pozitivní markery CD90.2, CD105, CD44 ve spodní řadě (šedě – negativní kontrola neznačených MSCs, modře – barvené MSCs kultivované ve standardním médiu, červeně – MSCs kultivované v médiu obsahujícím 5 µg/ml CsA)

### 6.2.1 Diferenciace MSCs

Jak bylo popsáno v kapitole č. 4.1., MSCs jsou definovány schopností diferenciace do 3 buněčných typů. Diferenciace indukovaná na použitých MSCs ukazuje jejich schopnost tvořit tyto 3 buněčné typy, a tedy dále potvrzuje, že se skutečně jedná o MSCs. Zároveň přidáním CsA (5 µg/ml) ke kultivačnímu médiu nedojde k ovlivnění diferenciace takto kultivovaných buněk (obr. 12).



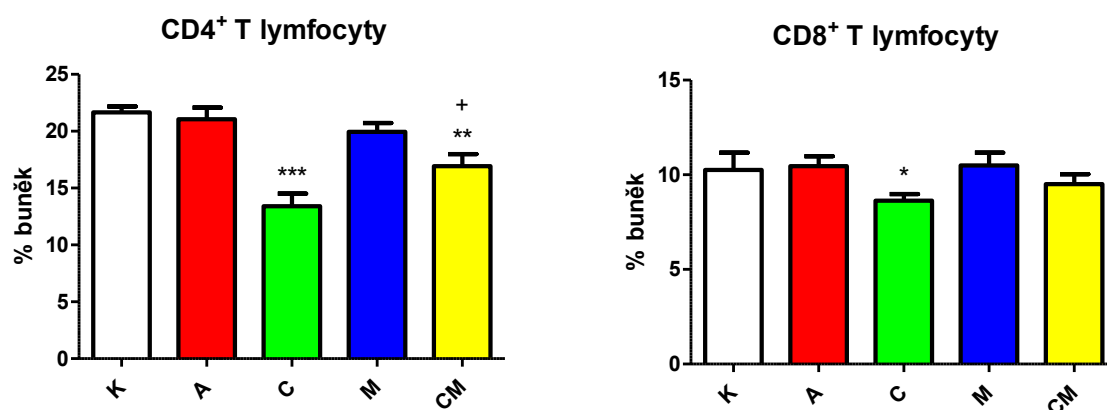




**Obrázek 11 – Diferenciace MSCs** – buňky kultivované bez přítomnosti (A, B, D, F) nebo v přítomnosti (C, E, G) CsA ( $5\mu\text{g/ml}$ ), u nichž byla navozena diferenciace na chondrocyty (B, C), osteocyty (D, E) a adipocyty (F, G), zvětšeno 100x (adipocyty zvětšeny 200x), chondrocyty barveny Alcian Blue, osteocyty barveny Alizarin Red S, adipocyty barveny Red Oil O

### 6.3 Změny v počtu T lymfocytů

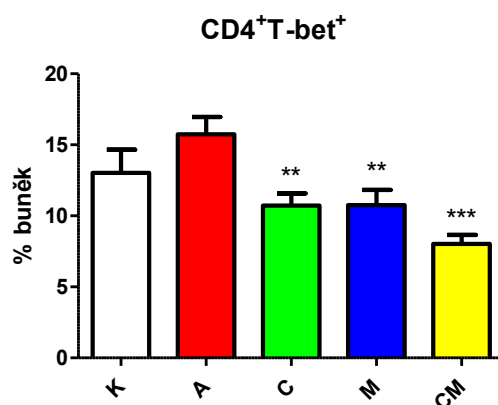
Jak bylo zmíněno výše, vlivem terapie CsA dochází ke snížení počtu T lymfocytů. Jelikož má práce byla zaměřená na možnost snížení negativních vlivů CsA prostřednictvím MSCs byl jedním ze sledovaných parametrů počet CD4 a CD8 pozitivních lymfocytů. Jak můžeme vidět na následujících grafech, u skupiny léčené CsA opravdu dochází k signifikantnímu poklesu, jak v případě CD4<sup>+</sup> tak v případě CD8<sup>+</sup> T lymfocytů (graf 1). Naopak v obou případech můžeme pozorovat navýšení zastoupení těchto populací u skupiny léčené kombinovanou terapií, což ukazuje na schopnost MSCs snižovat negativní dopady CsA. V případě CD4<sup>+</sup> populace se dokonce jedná o signifikantní nárůst vůči terapii pomocí CsA (<sup>+</sup>p < 0,05).



**Graf 1 – Změny v populaci CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů ve slezině 96 hodin po transplantaci alogenních buněk u skupin léčených odlišnými typy terapie** – měřeno pomocí průtokové cytometrie, data z pěti nezávislých pokusů, \*p < 0,05 \*\*p < 0,01 \*\*\*p < 0,001 signifikantně odlišné vůči A, <sup>+</sup>p < 0,05 signifikantně odlišné vůči C (K – kontrola, A – alogenní transplantace, C – léčba CsA, M – léčba MSCs, CM – kombinovaná terapie CsA a MSCs)

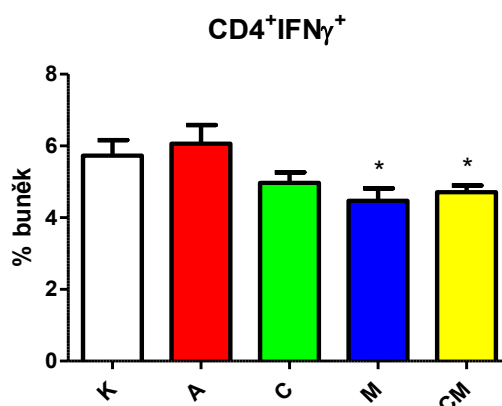
## 6.4 Th 1 populace

Zánětlivá reakce způsobená přítomností alogenního antigenu se manifestuje částečně zvýšením populace Th1. Měřením zastoupení  $CD4^+T\text{-bet}^+$  buněk, bylo zjištěno, že po aplikaci CsA i MSCs dochází k signifikantnímu poklesu této populace. Ovšem v případě kombinované terapie je pokles nejpatrnější, jak můžeme vidět na grafu 2.



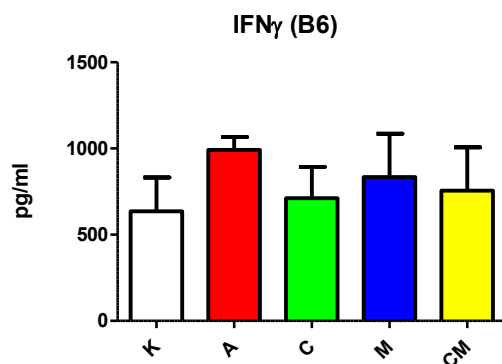
**Graf 2 – Procentuální zastoupení  $CD4^+T\text{-bet}^+$  T lymfocytů 96 hodin po transplantaci alogenních buněk – měřeno pomocí průtokové cytometrie na suspenzi Spl, data z 5 nezávislých pokusů, \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  signifikantně odlišné vůči A (K – kontrola, A – alogenní transplantace, C – léčba CsA, M – léčba MSCs, CM – kombinovaná terapie CsA a MSCs)**

Změny v populaci Th1 jsou patrné i v případě, kdy bylo měřeno procento zastoupení  $CD4^+IFN\gamma^+$ , který je pro Th1 odpověď typický. V případě měření intracelulárního  $IFN\gamma$  pomocí průtokové cytometrie vidíme signifikantní pokles pro varianty léčené pomocí všech přístupů (viz graf 3).



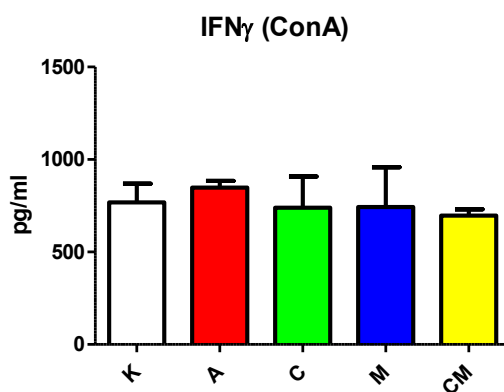
**Graf 3 – Procentuální zastoupení  $CD4^+IFN\gamma^+$  T lymfocytů – měřeno intracelulárně pomocí průtokové cytometrie na suspenzi Spl po 48hodinové kultivaci s inaktivovanými B6 Spl, data z pěti nezávislých pokusů, \* $p < 0,05$ , signifikantně odlišné vůči A (K – kontrola, A – alogenní transplantace, C – léčba CsA, M – léčba MSCs, CM – kombinovaná terapie CsA a MSCs)**

Pokud se podíváme na výsledky měření cytokinů pomocí ELISA, pak můžeme vidět, že produkce IFN $\gamma$ , po 48 hodinové kultivaci s inaktivovanými B6 Spl není signifikantně odlišná (graf 4).



**Graf 4 - Produkce cytokinu IFN $\gamma$  Spl BALB/c po společné kultivaci s inaktivovanými B6 Spl** – měřeno pomocí ELISA, data z 5 nezávislých pokusů (K – kontrola, A – alogenní transplantace, C – léčba CsA, M – léčba MSCs, CM – kombinovaná terapie CsA a MSCs)

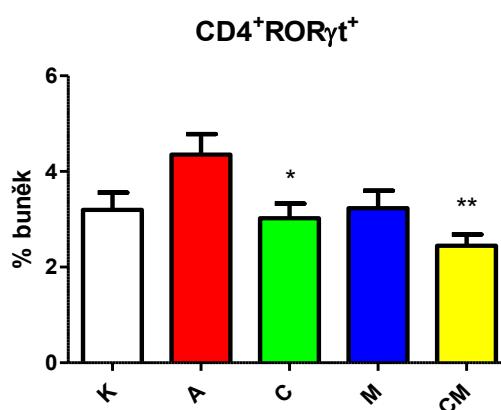
Produkce IFN $\gamma$  byla měřena i po stimulaci ConA. U tohoto experimentu nebyly detekovány rozdíly v produkci IFN $\gamma$  mezi jednotlivými skupinami.



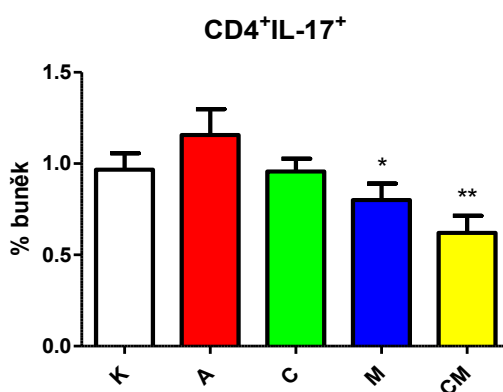
**Graf 5 – Produkce cytokinu IFN $\gamma$  Spl BALB/c po kultivaci s ConA (1,25 mg/ml)** – měřeno pomocí ELISA, data z 5 nezávislých pokusů (K – kontrola, A – alogenní transplantace, C – léčba CsA, M – léčba MSCs, CM – kombinovaná terapie CsA a MSCs)

## 6.5 Th 17 populace

Další z typicky zánětlivých populací, jejíž změny byly v rámci pokusů pozorovány, je populace Th17. Procento  $CD4^+ROR\gamma^+$  (thymus specific RAR related orphan receptor gamma) buněk bylo sníženo, v případě skupiny léčené kombinovanou terapií bylo procento pozitivních buněk dokonce nižší než u obou zbývajících přístupů (graf 6). Cytokinem produkovaným populací Th17 je IL-17, jehož intracelulární produkce byla měřena pomocí průtokové cytometrie. Jak můžeme vidět na grafu 7 pokles  $CD4^+IL-17^+$ , který je nejvýznamnější v případě kombinované terapie, koreluje s poklesem populace Th17 naměřené pomocí  $ROR\gamma^+$ .

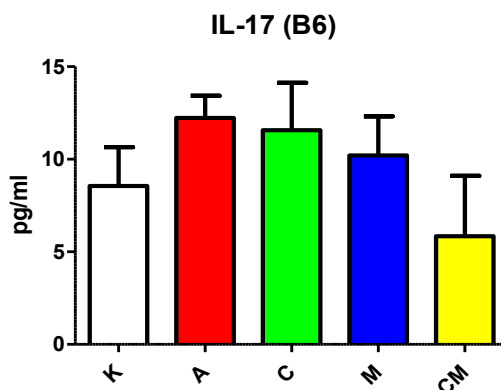


**Graf 6 – Procentuální zastoupení  $CD4^+ROR\gamma^+$  T lymfocytů 96 hodin po transplantaci alogenních buněk – měřeno intracelulárně pomocí průtokové cytometrie, data z 5 nezávislých pokusů, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , signifikantně odlišné vůči A (K – kontrola, A – alogenní transplantace, C – léčba CsA, M – léčba MSCs, CM – kombinovaná terapie CsA a MSCs)**



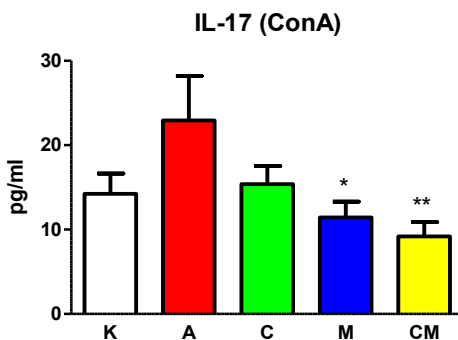
**Graf 7 – Procentuální zastoupení  $CD4^+IL-17^+$  T lymfocytů – měřeno intracelulárně pomocí průtokové cytometrie, data z 5 nezávislých pokusů, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , signifikantně odlišné vůči A (K – kontrola, A – alogenní transplantace, C – léčba CsA, M – léčba MSCs, CM – kombinovaná terapie CsA a MSCs)**

U produkce IL-17 měřené pomocí ELISA na Spl, kultivovaných po dobu 72 hodin v přítomnosti inaktivovaných B6 Spl, pak lze pozorovat podobný trend jako v případě CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>. Zde ovšem hodnoty nedosáhly signifikantního poklesu (graf 8).



**Graf 8 - Produkce cytokinu IL-17 Spl BALB/c po kokultivaci s inaktivovanými B6 Spl** – měřeno pomocí ELISA, data z 5 nezávislých pokusů (K – kontrola, A – alogenní transplantace, C – léčba CsA, M – léčba MSCs, CM – kombinovaná terapie CsA a MSCs)

Pokles produkce IL-17 u kombinované terapie je ještě lépe vidět v případě stimulace pomocí ConA, kde oba přístupy využívající kmenových buněk signifikantně snižují jeho hladinu (graf 9).

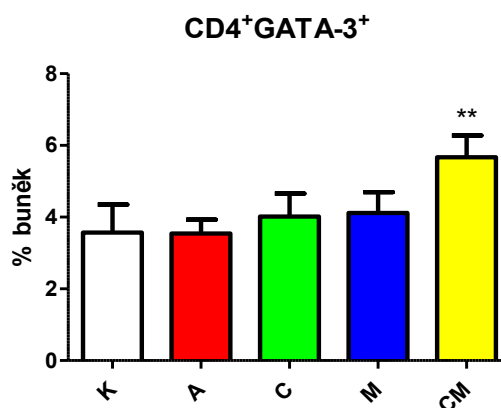


**Graf 9 - Produkce cytokinu IL-17 Spl BALB/c po stimulaci ConA (1,25 µg/ml)** – měřeno pomocí ELISA, data z 5 nezávislých pokusů, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , signifikantně odlišné vůči A (K – kontrola, A – alogenní transplantace, C – léčba CsA, M – léčba MSCs, CM – kombinovaná terapie CsA a MSCs)

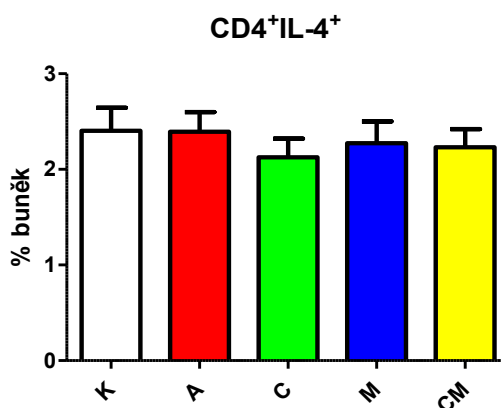
U obou populací souvisejících tradičně se zánětlivou reakcí dochází v případě kombinované terapie k poklesu jak u populace samotné, tak u cytokinů s ní souvisejících. Výsledky souhrnně značí snížení zánětlivé odpovědi po aplikaci kombinované terapie oproti každé z použitých monoterapií.

## 6.6 Th 2 populace

Další populací, na kterou jsme se zaměřili je populace Th2 lymfocytů. Procento  $CD4^+GATA-3^+$  (GATA binding protein 3, GATA vázající protein 3) buněk odpovídajících populaci Th2 bylo v rámci jednotlivých skupin relativně porovnatelné s výjimkou skupiny léčené pomocí kombinované terapie, kde byl detekován nárůst exprese (graf 10). V procentuálním zastoupení  $CD4^+IL-4^+$  populací potom nebyly detekovány žádné rozdíly (graf 11).

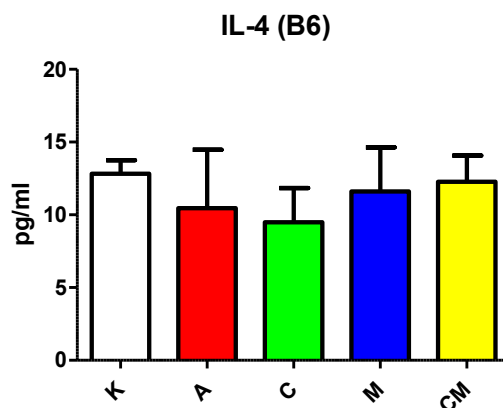


**Graf 10 – Procentuální zastoupení  $CD4^+GATA-3^+$  T lymfocytů 96 hodin po transplantaci alogenních buněk – měřeno intracelulárně pomocí průtokové cytometrie na suspenzi Spl, data z 5 nezávislých pokusů, \*\* $p < 0,01$ , signifikantně odlišné vůči A (K – kontrola, A – alogenní transplantace, C – léčba CsA, M – léčba MSCs, CM – kombinovaná terapie CsA a MSCs)**

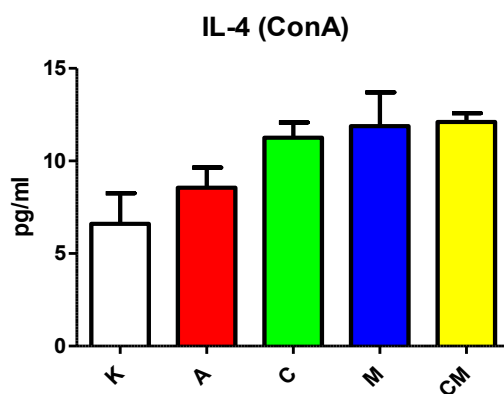


**Graf 11 – Procentuální zastoupení  $CD4^+IL-4^+$  T lymfocytů – měřeno intracelulárně pomocí průtokové cytometrie, data z 5 nezávislých pokusů (K – kontrola, A – alogenní transplantace, C – léčba CsA, M – léčba MSCs, CM – kombinovaná terapie CsA a MSCs)**

V případě ELISA testů nebyla po 72 hodinách u stimulace pomocí inaktivovaných B6 Spl pozorována žádná signifikantní změna (graf 12). Pro hladinu IL-4 měřeného po stimulaci pomocí ConA, pak platí, že je zvýšena bez signifikance u všech léčených skupin (graf 13).



**Graf 12 – Produkce cytokinu IL-4 Spl BALB/c po 72hodinové kokultivaci s inaktivovanými B6 Spl** – měřeno pomocí ELISA, data z 5 nezávislých pokusů (K – kontrola, A – alogenní transplantace, C – léčba CsA, M – léčba MSCs, CM – kombinovaná terapie CsA a MSCs)

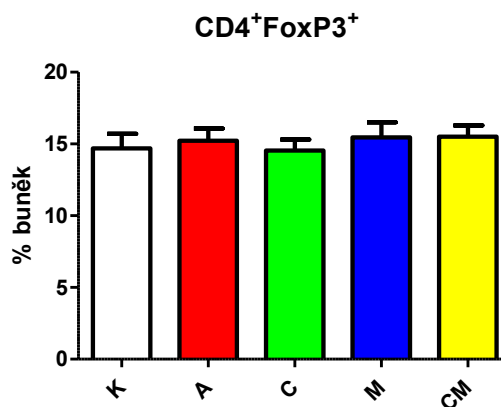


**Graf 13 - Produkce cytokinu IL-4 Spl BALB/c po 72hodinové kultivaci s ConA (1,25 µg/ml)** – měřeno pomocí ELISA, data z 5 nezávislých pokusů (K – kontrola, A – alogenní transplantace, C – léčba CsA, M – léčba MSCs, CM – kombinovaná terapie CsA a MSCs)

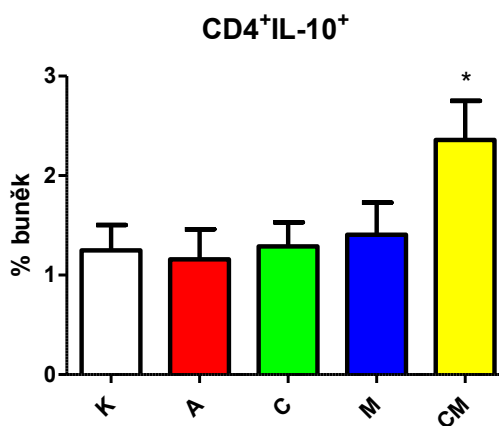


## 6.7 T<sub>reg</sub> populace

Procento T<sub>reg</sub> definovaných jako CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> nebylo v případě sledovaných skupin změněno (graf 14). Naproti tomu procentuální zastoupení CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> vykazuje v případě kombinované terapie signifikantní nárůst (graf 15).

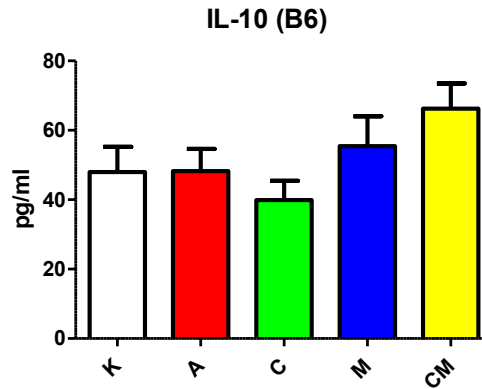


**Graf 14 – Procentuální zastoupení CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T lymfocytů 96 hod po transplantaci alogenních buněk – měřeno intracelulárně pomocí průtokové cytometrie na suspenzi Spl, data z 5 nezávislých pokusů (K – kontrola, A – alogenní transplantace, C – léčba CsA, M – léčba MSCs, CM – kombinovaná terapie CsA a MSCs)**

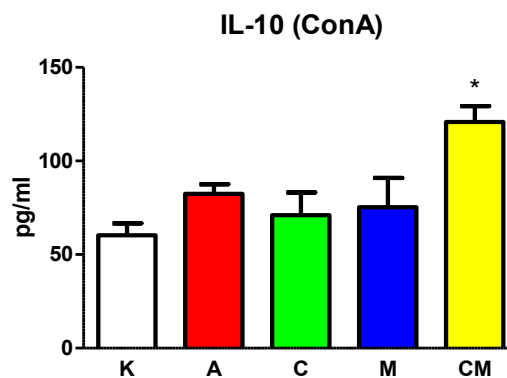


**Graf 15 – Procentuální zastoupení CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> T lymfocytů – měřeno intracelulárně pomocí průtokové cytometrie, data z 5 nezávislých pokusů, \* $p < 0,05$ , signifikantně odlišné vůči A (K – kontrola, A – alogenní transplantace, C – léčba CsA, M – léčba MSCs, CM – kombinovaná terapie CsA a MSCs)**

V případě výsledků z ELISA se opakují stejné trendy, kdy je v případě stimulace pomocí inaktivovaných B6 Spl hladina IL-10 nesignifikantně zvýšena u skupiny podstupující kombinovanou formu terapie (graf 16). V případě stimulace pomocí ConA, je nárůst IL-10 u kombinované terapie signifikantní (graf 17).



**Graf 16 - Produkce cytokinu IL-10 Spl BALB/c po 72hodinové kokultivaci s inaktivovanými B6 Spl** – měřeno pomocí ELISA, data z 5 nezávislých pokusů (K – kontrola, A – alogenní transplantace, C – léčba CsA, M – léčba MSCs, CM – kombinovaná terapie CsA a MSCs)

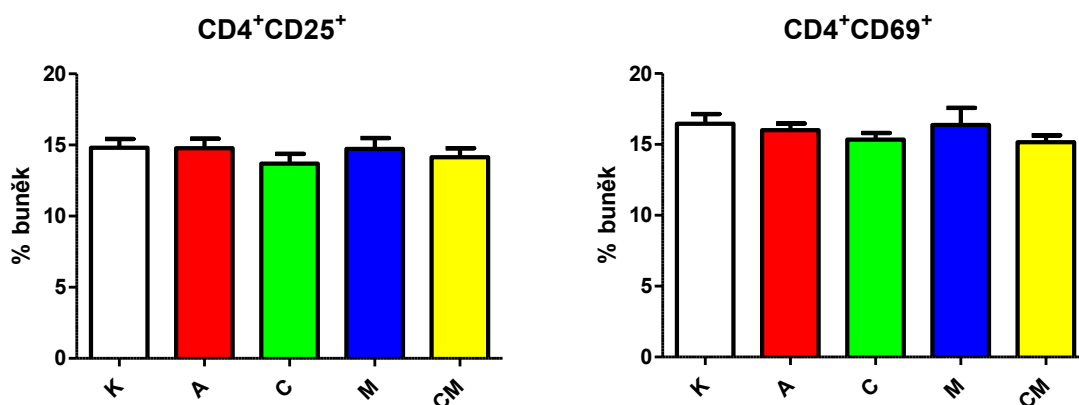


**Graf 17 - Produkce cytokinu IL-10 Spl BALB/c po 72hodinové kultivaci s ConA** – měřeno pomocí ELISA, data z 5 nezávislých pokusů, \* $p < 0,05$ , signifikantně odlišné vůči A, (K – kontrola, A – alogenní transplantace, C – léčba CsA, M – léčba MSCs, CM – kombinovaná terapie CsA a MSCs)

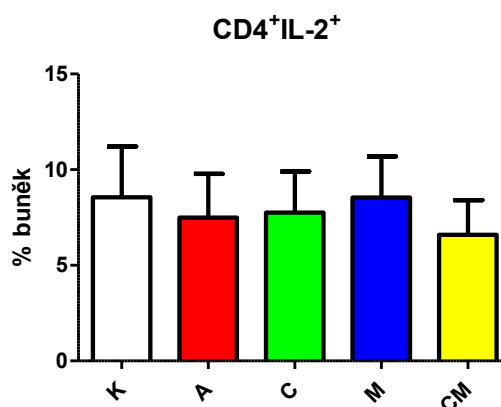
## 6.8 Aktivace T lymfocytů

Součástí zkoumaných parametrů byla také aktivace T lymfocytů. Aktivace byla měřena na průtokovém cytometru a sledovanými markery byly CD25, CD69 a produkce IL-2 a IFN $\gamma$ . Aktivace byla měřena v den odebrání vzorků (4. den po transplantaci).

V populaci CD4<sup>+</sup> T lymfocytů nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl v případě povrchových znaků (grafy 18). V případě IL-2 nebyla pozorována žádná signifikantní odchylka, ovšem v případě skupiny podstupující kombinovanou terapii je možné vidět tendenci ke snížení (graf 19).

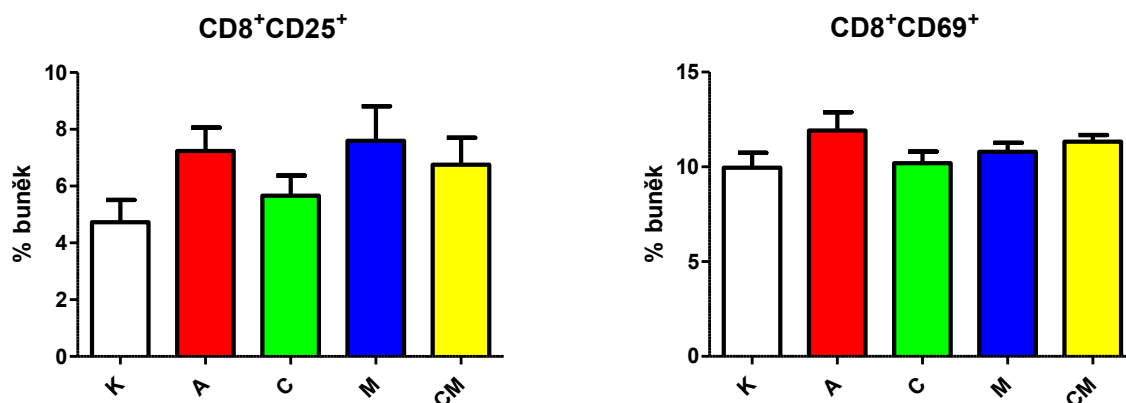


**Graf 18 – Procentuální zastoupení CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> a CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> T lymfocytů 96 hodin po transplantaci alogenních buněk – měřeno pomocí průtokové cytometrie na suspenzi Spl, data z 5 nezávislých pokusů (K – kontrola, A – alogenní transplantace, C – léčba CsA, M – léčba MSCs, CM – kombinovaná terapie CsA a MSCs)**



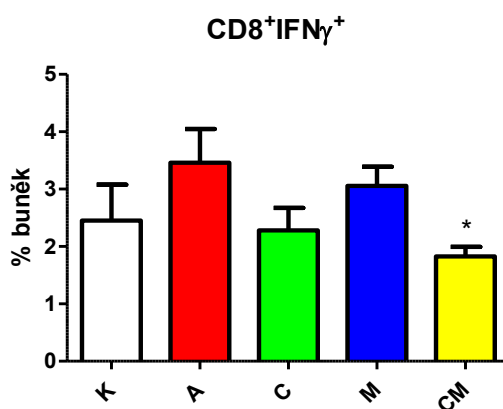
**Graf 19 – Procentuální zastoupení CD4<sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup> T lymfocytů – měřeno intracelulárně pomocí průtokové cytometrie, data z 5 nezávislých pokusů (K – kontrola, A – alogenní transplantace, C – léčba CsA, M – léčba MSCs, CM – kombinovaná terapie CsA a MSCs)**

Pro populaci CD8<sup>+</sup> T lymfocytů platí, že expresi CD25 můžeme pozorovat v nejvyšší míře u myší podstupujících transplantaci, které nepodstupovaly žádný druh léčby a u myší, které byly léčeny pouze pomocí MSCs. Výsledky nejsou signifikantně odlišné, a to jak u CD25<sup>+</sup> tak u CD69<sup>+</sup> buněk, u obou markerů je pak vidět tendence k poklesu u skupin léčených CsA (graf 20).



**Graf 20 – Procentuální zastoupení CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> T lymfocytů 96 hodin po transplantaci alogenních buněk – měřeno pomocí průtokové cytometrie na suspenzi Spl, data z 5 nezávislých pokusů (K – kontrola, A – alogenní transplantace, C – léčba CsA, M – léčba MSCs, CM – kombinovaná terapie CsA a MSCs)**

V případě procentuálního zastoupení CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> buněk měřených po 48hodinové kultivaci s inaktivovanými Spl dochází u kombinované terapie k signifikantnímu snížení jejich početnosti (graf 21).

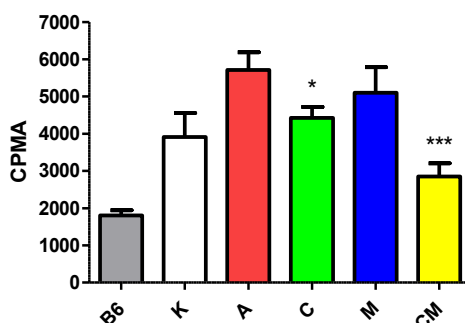


**Graf 21 – Procentuální zastoupení CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T lymfocytů – měřeno intracelulárně pomocí průtokové cytometrie, data z 5 nezávislých pokusů, \*p < 0,05, signifikantně odlišné vůči A (K – kontrola, A – alogenní transplantace, C – léčba CsA, M – léčba MSCs, CM – kombinovaná terapie CsA a MSCs)**

## 6.9 Jednostranná MLC

Vzhledem k pozorovaným změnám v populacích T lymfocytů jsme sledovali proliferaci Spl získaných z jednotlivých skupin po sekundárním setkání s antigenem. Zvýšení proliferace pozorované u

skupiny A bylo nejvíce potlačeno u skupin podstupujících kombinovanou terapii, kde je vidět velmi výrazný signifikantní pokles oproti všem ostatním léčebným přístupům (graf 22).

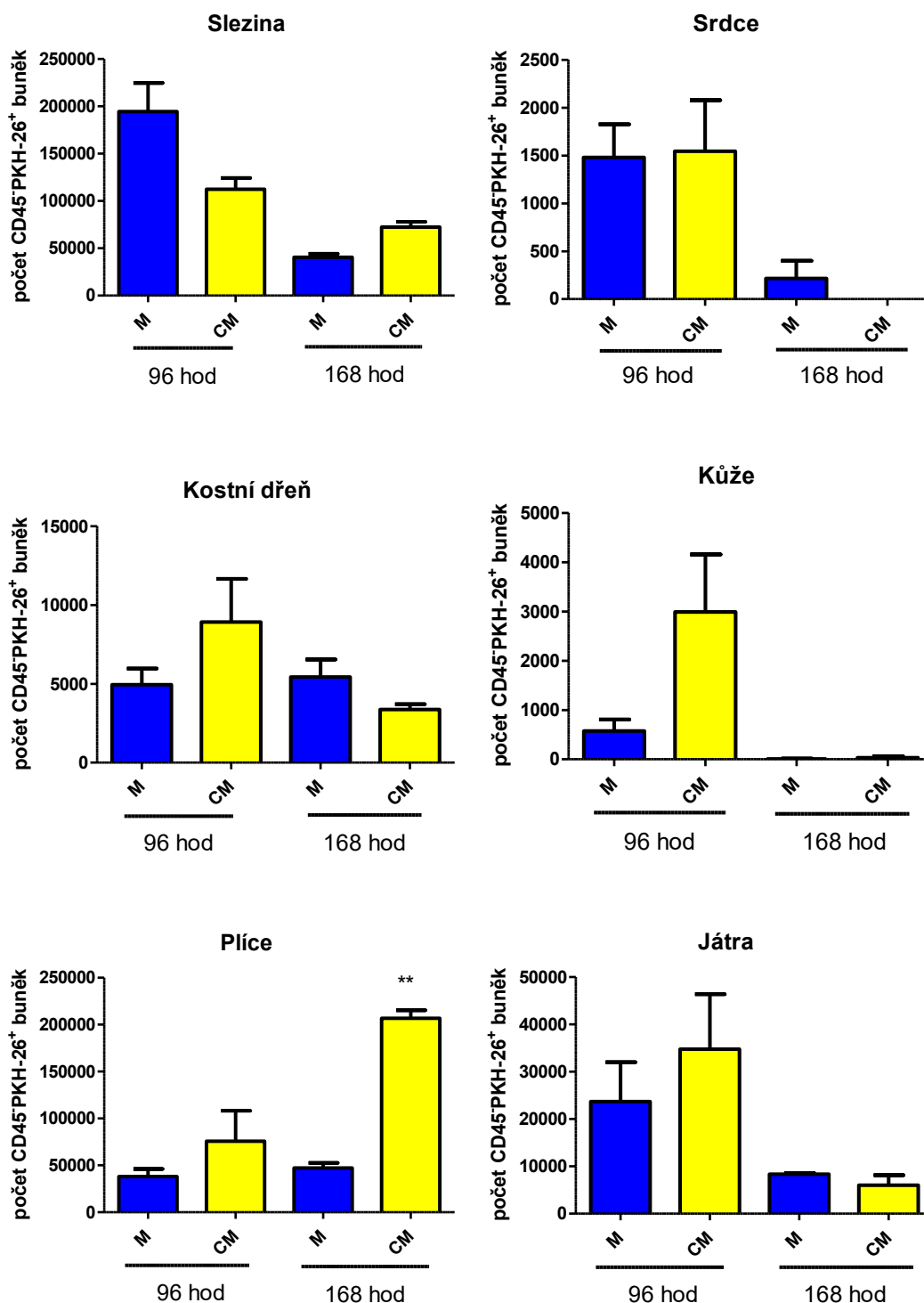


**Graf 22 – Jednostranná MLC BALB/c Spl kokultivovaných 96 hodin s inaktivovanými B6 Spl** – měřeno pomocí inkorporace  $^3\text{H}$ -thymidinu, data z 5 nezávislých pokusů, \* $p < 0,05$  \*\*\* $p < 0,001$ , signifikantně odlišné vůči A (B6 – inaktivované B6 Spl, K – kontrola, A – alogenní transplantace, C – léčba CsA, M – léčba MSCs, CM – kombinovaná terapie CsA a MSCs)

## 6.10 Migrace MSC v organismu

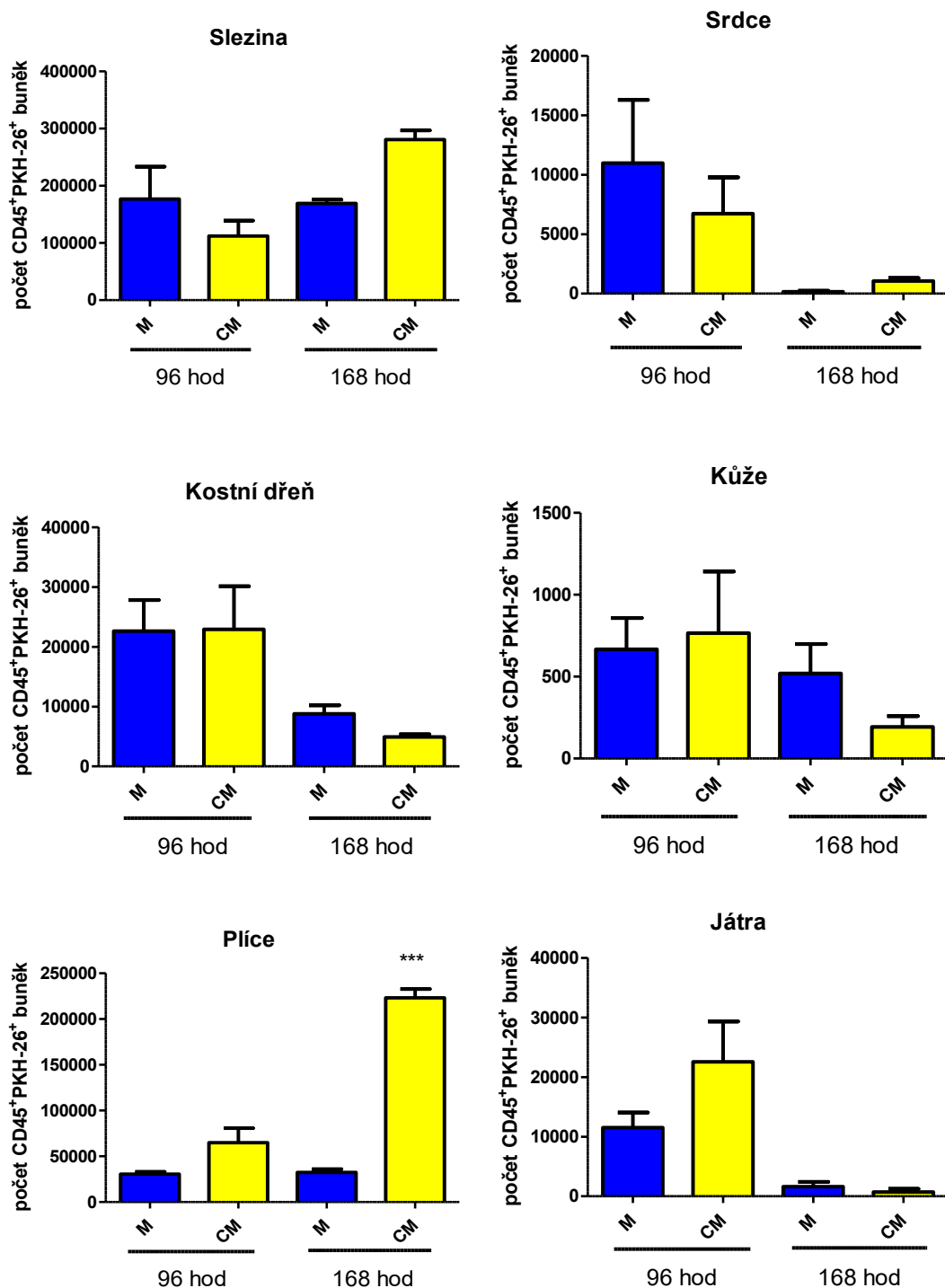
V poslední fázi experimentů jsme se zaměřili na možnost ovlivnění distribuce MSCs v organismu vlivem CsA. Věnovali jsme se jak na přítomnosti MSCs negativních na znak leukocytů CD45 ve sledovaných orgánech (slezina, srdce, kostní dřeň, kůže, plíce a játra) (soubor grafů 25), tak na CD45<sup>+</sup>PKH-26<sup>+</sup> buňky, u kterých přepokládáme, že byly pohlceny fagocyty (soubor grafů 26). V případě CD45<sup>+</sup>PKH-26<sup>+</sup> MSC byla většina z aplikované dávky zachycena v silně prokrvených orgánech a orgánech s malými kapilárami, jako jsou například plíce a slezina. Stejně tak nejvíce CD45<sup>+</sup>PKH-26<sup>+</sup> buněk bylo pozorováno v těchto orgánech.

Jak se ukázalo, v případě kombinované terapie přežívá v organismu celkově větší počet MSC po delší dobu. Zároveň u kombinované terapie je zvýšený počet MSCs v místě poranění. Po 96 hodinách byl největší počet buněk v silně prokrvených orgánech, jako je slezina, srdce a játra. Nejvíce živých buněk bylo po 168 hodinách ve slezině a plicích, zatímco velmi malý počet buněk byl detekován v kůži a játrech. Výskyt MSCs v srdci nebyl po 168 hodinách zaznamenán. Zajímavým faktem byl poměrně vysoký počet živých buněk v případě kostní dřeně a nárůst v počtu živých MSCs v plicích po 168 hodinách



**Graf 23 – Grafy znázorňující přežívání MSCs v organismu a jejich distribuci v jednotlivých orgánech ve dvou časových intervalech (96 a 168 hodin) po transplantaci – MSCs značeny pomocí PKH-26, měřeno pomocí průtokové cytometrie, data z 3 nezávislých pokusů, \*\* $p < 0,01$ , signifikantní vůči M – 168 hod (M – léčba MSCs, CM – kombinovaná terapie CsA a MSCs)**

V případě CD45<sup>+</sup>PKH-26<sup>+</sup> buněk byl největší počet opět v plicích a slezině. Jedná se nejspíše o fagocytované buňky nebo jejich části.



**Graf 24 - Grafy znázorňující počty pravděpodobně fagocytovaných MSCs v organismu a jejich distribuci v jednotlivých orgánech ve dvou časových intervalech (96 a 168 hodin) po transplantaci – MSCs značeny pomocí PKH-26, měřeno pomocí průtokové cytometrie, data z 5 nezávislých pokusů, \*\*\* $p < 0,001$ , signifikantní vůči M - 168 hod (M – léčba MSCs, CM – kombinovaná terapie CsA a MSCs)**

Celkově výsledky ukazují na ovlivnění organismu CsA, které umožní MSCs déle přežít v orgánech, kde se kumulují po intravenózní aplikaci (například plíce). V takových orgánech byl v obou případech v rámci kombinované terapie nárůst živých buněk.

## 7 Diskuse

V posledních letech je hojně studována možnost používat kmenové buňky jako náhradu imunosupresivní terapie. Jak se ovšem ukazuje, samotná terapie pomocí kmenových buněk není v mnoha případech dostačující. Jako vhodná alternativa, která sdružuje výhody obou přístupů, se pak jeví kombinovaná terapie pomocí CsA a MSCs. Odborných prací, které by se zabývaly touto problematikou je ovšem jen malé množství a vztahy mezi kmenovými buňkami a imunosupresivní terapií nejsou dostatečně uspokojivě popsány.

Při fenotypizaci MSCs nebyly na použitých buňkách zaznamenány markery typické pro hematopoetickou linii CD45, CD31 a CD11b. Současně byly přítomny markery typické pro populaci MSCs jako je CD90.2, CD105 a CD44. Diferenciace MSCs dala vzniknout 3 typům buněk, chondrocytům, osteocytům a adipocytům, jejichž přítomnost byla potvrzena příslušným barvením. Pozorované vlastnosti použitých MSCs jsou ve shodě s mezinárodními standarty pro MSCs (Dominici *et al.*, 2006) a zároveň byly ve shodě s výsledky pozorovanými v jiných laboratořích (Kern *et al.*, 2006; Sung *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2018). Qu *et al.* ve své publikaci poukazovali na ovlivnění MSCs a jejich neschopnost diferencovat do adipocytů vlivem CsA (Qu *et al.*, 2018). Při mnou prováděné kultivaci a diferenciaci MSCs s CsA nebyl však pozorován žádný negativní vliv použité koncentrace CsA na tyto buňky, což je ve shodě s publikovanými výsledky jak jiných pracovišť, tak naší laboratoře (Chen *et al.*, 2008; Javorkova *et al.*, 2018). Rozdílnost v těchto datech je pravděpodobně způsobena odlišnou dobou kultivace a odlišnou metodikou.

Po podání CsA jsme v našem *in vivo* modelu pozorovali signifikantní pokles CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> lymfocytů, což je známý vedlejší účinek této imunosupresivní terapie způsobený zásahem CsA do NF-AT dráhy (Jenkins, Schwartz and Pardoll, 1988; Prud'homme *et al.*, 1995). Při podání MSC nebyl pozorován pokles ani jedné z těchto populací. Naopak po aplikaci kombinované terapie byl na obou populacích T lymfocytů pozorován nárůst oproti terapii pomocí CsA. To poukázalo na schopnost MSCs zvyšovat počty CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů zpět k hodnotám, které odpovídají kontrolním skupinám. Můžeme tedy vidět potlačení jednoho z nežádoucích vedlejších účinků CsA. Jedním z možných vysvětlení může být produkce růstových faktorů lymfocytů, které jsou MSCs schopny za určitých podmínek tvořit. Jedná se především o TGF- $\beta$ , IL-7 a IL-4 (Zhou *et al.*, 2008; Normanton *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2018). Může se také jednat o potlačení apoptózy vlivem IL-6, který mohou MSCs produkovat (Xu *et al.*, 2007).

Jelikož je CsA látka, která primárně působí na T lymfocyty, probíhala další analýza právě na těchto buňkách. Na procentuálním zastoupení CD4<sup>+</sup>T-bet<sup>+</sup> buněk byl pozorován velmi signifikantní pokles v případě kombinované terapie. Současně byl pozorován signifikantní pokles procentuálního zastoupení CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> buněk. Tyto zjištění jsou ve shodě s publikovanými výsledky, které ukazují právě na schopnost MSCs potlačovat Th1 populaci (Ohshima *et al.*, 2012). Zároveň byl pozorován pokles



produkce IFN $\gamma$ . Výsledky z ELISA nebyly ani v jednom z případů signifikantní, nicméně obecně lze říci, že byl vidět určitý trend k poklesu IFN $\gamma$  v případě kombinované terapie. Tyto výsledky jsou shodné s publikovanými daty, která ukazují na schopnost MSCs inhibovat produkci tohoto cytokinu (Fiorina *et al.*, 2009).

S poklesem Th1 odpovědi je úzce spojen nárůst Th2, který je často popisován v literatuře, jelikož MSCs mají schopnost modulovat vztah těchto dvou populací (Zhou *et al.*, 2008; Ezquer *et al.*, 2012). Ve shodě s těmito publikovanými pracemi byly i námi pozorované výsledky. Procentuální zastoupení CD4<sup>+</sup>GATA-3<sup>+</sup> buněk bylo v případě kombinované terapie signifikantně zvýšeno. Naopak nebyla pozorována změna v produkci IL-4 žádnou z využívaných metod, a to jak po transplantaci, tak ani při pozdější kultivaci se specifickým antigenem, případně s nespecifickou stimulací pomocí ConA. Tyto výsledky se neshodují s publikovanými daty, které ukazují nárůst IL-4 (Choi *et al.*, 2008). Ovšem souhlasí s daty publikovanými jinou skupinou, která taktéž nepozorovala změny v produkci IL-4 (Sun *et al.*, 2010). To opět ukazuje na již v úvodu zmíněnou nejednotnost výsledků, kdy jsou MSCs schopny, jak potlačovat, tak podporovat Th2 odpověď a fungují tedy spíše jako mediátory rovnováhy mezi Th1 a Th2 v závislosti na momentálních podmínkách.

Současně s poklesem Th1 bylo pozorováno také snížení v další prozánětlivé populaci, Th17. Tento úbytek byl v případě kombinované terapie signifikantní a potlačení Th17 populace CD4<sup>+</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> bylo pozorováno i v případě monoterapie pomocí MSCs, tento pokles nebyl signifikantní. Uvedené výsledky souhlasí s dalšími publikovanými daty, které ukazují na schopnost MSCs potlačovat tuto populaci, například prostřednictvím produkce PGE<sub>2</sub> (Tatara *et al.*, 2011). Pozorovaný pokles Th17 koreluje s výsledky získanými po analýze produkce IL-17. Ten je v případě intracelulárního měření CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> buněk a nespecifické stimulace pomocí ConA signifikantně snížen v případě kombinované terapie.

Navzdory nezměněné expresi transkripčního faktoru FoxP3, který byl pozorován po aplikaci MSCs i jinou skupinou (Hsu *et al.*, 2013) jsme pozorovali signifikantně zvýšené množství IL-10. To v případě CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> buněk může být způsobeno produkcí IL-10 buňkami, které neexprimují FoxP3 (Moore *et al.*, 1989; Vieira *et al.*, 2004). Případně se může jednat o zvýšenou produkci IL-10 FoxP3<sup>+</sup> buňkami, bez jeho změny. To může být vysvětleno přítomností CsA, jelikož jak bylo ukázáno, imunosupresivní léčiva mohou mít vliv na proliferaci T<sub>reg</sub> lymfocytů bez vlivu na jejich funkci (Miroux *et al.*, 2012). Stejně výsledky byly pozorovány i v případě nespecifické stimulace Spl pomocí ConA měřené metodou ELISA. Nárůst produkované IL-10 může být vysvětlen schopností MSCs ovlivňovat ostatní typy imunitních buněk a indukovat u nich produkci IL-10, jedná se především o regulační B lymfocyty, jejichž produkce IL-10 je poměrně vysoká. Dále jde o alternativně aktivované M2 makrofágy a v neposlední řadě také o dendritické buňky, u kterých jsou MSCs schopny indukovat regulační fenotyp a mohou poté taktéž produkovat IL-10 (Cho *et al.*, 2014; Chao *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2017).

Kromě detekce zastoupení jednotlivých subpopulací T lymfocytů a produkce cytokinů jsme se zaměřili také na jejich aktivaci. V žádné ze sledovaných populací nebyly pozorovány změny v expresi povrchových aktivačních markerů. Absence změn v aktivaci může být způsobena pozdním odběrem vzorků, vzhledem ke kinetice těchto markerů, kdy je nejvyšší možný počet CD69 pozitivních buněk přítomen 24 hodin po stimulaci a CD25 pozitivních buněk 48-72 hodin po stimulaci a poté dochází k poklesu (Biselli *et al.*, 1992). Tomu by odpovídaly i změny pozorované v produkci cytokinů souvisejících s aktivací obou hlavních populací, kdy intracelulárně měřené procentuální zastoupení CD4<sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup> buněk mělo snižující se trend a intracelulárně měřené procentuální zastoupení CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> buněk bylo dokonce signifikantně sníženo. To poukazuje na změny, které proběhly v rámci imunitní odpovědi dříve a nebyly v rámci této práce analyzovány. Současně je pokles těchto cytokinů ve shodě s výsledky pozorovanými například skupinou Li *et al.* (Li *et al.*, 2014).

Dále jsme se zaměřili také na reakci Spl na sekundární setkání s antigenem. K tomu posloužila jednostranná MLC, která byla provedena na myších Spl. Tento experiment odhalil silné potlačení proliferační aktivity Spl pocházejících z myší podstupujících kombinovanou terapii. Výsledek je v částečné shodě s dříve publikovanými daty a je ve shodě se známými imunomodulačními vlastnostmi MSCs (Ringden *et al.*, 2003).

Zaměřili jsme se také na migraci značených MSCs. Pozorovaná distribuce MSCs odpovídá putování buněk krevním řečištěm, které bylo pozorováno i v dalších publikacích. MSCs jsou také často zachytávány ve velmi prokrvených orgánech, jako jsou například plíce, kde zůstávají zachyceny především díky své velikosti, která jim znemožní průchod kapilárami (Fischer *et al.*, 2008; Toma *et al.*, 2009). Dále pokračují vlivem krevního řečiště do jater a sleziny (Gholamrezanezhad *et al.*, 2011). K dalšímu zachycení dochází díky adhezivním molekulám, jako je ICAM-1 a VCAM-1 (Segers *et al.*, 2005; Deak *et al.*, 2010). Důležitá byla migrace MSCs do místa zánětu vyvolaného transplantací buněk, kterou jsme pozorovali. To odpovídá publikovaným datům, které ukazují na schopnost MSCs migrovat do místa poranění (Kidd *et al.*, 2009). Cílená migrace je umožněna receptory růstových faktorů a chemokinových receptorů, které MSCs exprimují (Ponte *et al.*, 2007). Zajímavý byl fakt, že MSCs migrovaly do kostní dřeně, což je ve shodě s publikovanými výsledky a dochází k němu pravděpodobně vlivem CXCR4, který je schopný podporovat migraci do kostní dřeně a je MSCs exprimován (Wynn Robert F *et al.*, 2004; Kraitchman *et al.*, 2005). Velmi zajímavý byl výsledek sledování migrace značených MSCs, které byly současně pozitivní na CD45, tím pádem šlo nejspíše o fagocytované buňky, případně fagocyty, které pohltily část rozpadlé buňky. Což není velkým problémem, protože jak bylo ukázáno jsou fagocyty po pohlcení MSCs schopny částečně přebírat jejich funkci a modulovat imunitní odpověď podobným způsobem (de Witte *et al.*, 2018). Počet CD45+PKH-26+ buněk klesal v průběhu času ve všech sledovaných orgánech, jak bylo předpokládáno, s výjimkou srdce a plic, kde byl ve všech provedených opakováních pozorován nárůst v průběhu času. V případě plic se jednalo dokonce a vysoce signifikantní přírůstek. Jelikož byl tento fenomén pozorován pouze v případě kombinované terapie, souvisí tato

skutečnost pravděpodobně s efektem CsA na imunitní systém jako celek, přičemž může dojít k delšímu přežívání MSCs v takto suprimovaném organismu. To by odpovídalo publikovaným výsledkům, kdy bylo po podání imunosupresiv pozorováno navýšení protizánětlivé aktivity MSCs (Togha *et al.*, 2017). Stejně tak bylo pozorováno navýšení exprese PD-L2 na MSCs vlivem CsA (Qu *et al.*, 2018). Oba tyto procesy mohou vést ke snížení úmrtnosti MSCs v organismu. Z toho důvodu může dojít k jejich pozdější redistribuci, případně k delšímu přežívání a následné fagocytóze, přičemž fagocyty poté putují zpět do míst, kde jsou vzhledem ke své funkci fyziologicky nejvíce zastoupeny, jako jsou například plíce. Jejich migrace pomocí krevního řečiště by pak vysvětlovala zároveň i zvýšený počet takto značených buněk v srdci. Tuto mou domněnku se mi bohužel nepodařilo ověřit v odborné literatuře.

Během práce jsme nepozorovali žádné negativní vlivy na efektivitu MSCs, které by souvisely se současným podáním imunosupresivní terapie, což je ve shodě jak s předchozími výsledky naší laboratoře (Hajkova, *et al.*, 2017a). Stejně tak i s výsledky pozorovanými na *in vivo* modelu dalšími skupinami (Pischiutta *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2018).

*In vivo* model využitý v mé práci byl navržen tak, aby transplantací vyvolaná odpověď nebyla příliš razantní a byla u ní tak možnost pozorovat imunomodulační schopnosti MSCs. Je otázka, jaké výsledky by použitý přístup poskytl v případě transplantace vyvolávající silnou imunitní odpověď. Pokud se podíváme do literatury, můžeme nalézt případy, kdy jsou MSCs úspěšně používány například pro léčbu steroid-resistantního GvHD, kdy je požadovaného efektu dosaženo pouze podáním MSCs (Y. Peng *et al.*, 2015). Současně můžeme nalézt publikovaná data zabývající se použitím imunosupresivní terapie současně s aplikací MSCs v rozdílných případech transplantací i onemocnění. Jak je na těchto datech vidět, kombinovaná terapie poskytuje výhody a zároveň nepřináší zvýšená rizika (Eggenhofer, 2010; Togha *et al.*, 2017). Proto se domnívám, že je postup využívající sníženou dávku imunosupresivních léčiv doplněných aplikací MSCs použitelný i v závažnějších případech s vyšší mírou imunitní odpovědi. Je nicméně nutné přistupovat k němu velmi zodpovědně a co nejpečlivěji volit velikost dávky a poměr mezi nimi.

## 8 Závěr

- Přítomnost CsA (5 µg/ml) v kultivačním médiu nemá vliv na fenotyp ani diferenciaci MSCs
- V *in vivo* transplantačním modelu působí kombinovaná terapie pomocí CsA a MSCs na pokles T lymfocytů vyvolaný CsA a zvyšuje jejich zastoupení oproti samotné monoterapii pomocí CsA
- Terapie pomocí CsA a MSCs snižuje procentuální zastoupení prozánětlivých populací T lymfocytů ( $CD4^+ROR\gamma^+$ ,  $CD4^+T\text{-bet}^+$ ) a jim odpovídajících cytokinů (IL-17, IFN $\gamma$ )
- Kombinovaná terapie zvyšuje procentuální zastoupení  $CD4^+GATA-3^+$  buněk a nemění zastoupení  $CD4^+FoxP3^+$  buněk v porovnání s oběma monoterapiemi a současně také zvyšuje procentuální zastoupení  $CD4^+IL-10^+$  lymfocytů stejně jako hladinu IL-10
- Po kombinované terapii vykazují Spl signifikantně nižší proliferaci po sekundárním setkání se specifickým antigenem
- U myši, kterým byl podán CsA byla potvrzena delší přítomnost MSCs v organismu
- Výsledky ukazují na obnovu rovnováhy mezi zánětlivou a protizánětlivou imunitní odpovědí

Na základě pozitivních výsledků v experimentálních modelech je třeba se dále podrobněji zaměřit na vztah imunosupresivní terapie a buněčné terapie. Pouze vysoký stupeň poznání v této oblasti otevře možnosti využití kombinované terapie v klinické praxi.

## 9 Zdroje

Akiyama, K. *et al.* (2012) 'Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis', *Cell Stem Cell*. Elsevier Inc., 10(5), pp. 544–555. doi: 10.1016/j.stem.2012.03.007.

Asari, S. *et al.* (2009) 'Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation', *Experimental Hematology*, 37(5), pp. 604–615. doi: 10.1016/j.exphem.2009.01.005.

Augello, A. *et al.* (2005) 'Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway', *European Journal of Immunology*, 35(5), pp. 1482–1490. doi: 10.1002/eji.200425405.

Ball, L. M. *et al.* (2007) 'Cotransplantation of ex vivo-expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation', *Blood*, 110(7), pp. 2764–2767. doi: 10.1182/blood-2007-04-087056.

Bier, A. *et al.* (2018) 'Placenta-derived mesenchymal stromal cells and their exosomes exert therapeutic effects in Duchenne muscular dystrophy', *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 174, pp. 67–78. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.04.055.

Biselli, R. *et al.* (1992) 'Multiparametric flow cytometric analysis of the kinetics of surface molecule expression after polyclonal activation of human peripheral blood T lymphocytes', *Scandinavian Journal of Immunology*, 35(4), pp. 439–447. doi: 10.1111/j.1365-3083.1992.tb02879.x.

\*Le Blanc, K. (2003) 'Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells', *Cytotherapy*, 5, pp. 485–489. doi: 10.1080/14653240310003611.

Le Blanc, K. *et al.* (2004) 'Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes', *Scandinavian Journal of Immunology*, 60(3), pp. 307–315. doi: 10.1111/j.0300-9475.2004.01483.x.

Bohringer, J. *et al.* (2010) 'Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells', *Blood*, 116(19), pp. 3770–3779. doi: 10.1182/blood-2010-02-270777.

\*Borel, J. F. *et al.* (1994) 'Biological effects of cyclosporin A: A new antilymphocytic agent', *Agents and Actions*, 43(3–4), pp. 179–186. doi: 10.1007/BF01986686.

Bouffi, C. *et al.* (2010) 'IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis', *PLoS ONE*, 5(12). doi: 10.1371/journal.pone.0014247.

- \*Britton, S. and Palacios, R. (1982) 'Cyclosporin A – Usefulness, Risks and Mechanism of Action', *Immunological Reviews*, 65(1), pp. 5–22. doi: 10.1111/j.1600-065X.1982.tb00425.x.
- Česen Mazič, M. *et al.* (2018) 'Treatment of severe steroid-refractory acute-graft-vs.-host disease with mesenchymal stem cells–single center experience', *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6(July), pp. 1–6. doi: 10.3389/fbioe.2018.00093.
- Chao, K. *et al.* (2016) 'Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells protect against experimental colitis via CD5+ B regulatory cells', *Stem Cell Research and Therapy*. Stem Cell Research & Therapy, 7(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s13287-016-0376-2.
- Chen, T. L. *et al.* (2008) 'Cyclosporin A pre-incubation attenuates hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells', *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 68(7), pp. 585–593. doi: 10.1080/00365510801918761.
- Cho, D. I. *et al.* (2014) 'Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages', *Experimental and Molecular Medicine*. Nature Publishing Group, 46(1), pp. e70-9. doi: 10.1038/emm.2013.135.
- Choi, J. J. *et al.* (2008) 'Mesenchymal stem cells overexpressing interleukin-10 attenuate collagen-induced arthritis in mice', *Clinical and Experimental Immunology*, 153(2), pp. 269–276. doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03683.x.
- Deak, E. *et al.* (2010) 'Suspension medium influences interaction of mesenchymal stromal cells with endothelium and pulmonary toxicity after transplantation in mice', *Cytotherapy*. Elsevier, 12(2), pp. 260–264. doi: 10.3109/14653240903401840.
- Dominici, M. *et al.* (2006) 'Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement', *Cytotherapy*, 8(4), pp. 315–317. doi: 10.1080/14653240600855905.
- Eggenhofer, E. (2010) 'Mesenchymal stem cells together with mycophenolate mofetil inhibit antigen presenting cell and T cell infiltration into allogeneic heart grafts', *Transplant Immunology*, 24, pp. 157–163. doi: 10.1016/S0022-3468
- English, K., Barry, F. P. and Mahon, B. P. (2008) 'Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation', *Immunology Letters*, 115(1), pp. 50–58. doi: 10.1016/j.imlet.2007.10.002.

- Ezquer, F. *et al.* (2012) 'The antidiabetic effect of mesenchymal stem cells is unrelated to their transdifferentiation potential but to their capability to restore Th1/Th2 balance and to modify the pancreatic microenvironment', *Stem Cells*, 30(8), pp. 1664–1674. doi: 10.1002/stem.1132.
- Fiorina, P. *et al.* (2009) 'Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes', *The Journal of Immunology*, 183(2), pp. 993–1004. doi: 10.4049/jimmunol.0900803.
- Fischer, U. M. *et al.* (2008) 'Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect', *Stem Cells and Development*, 18(5), pp. 683–692. doi: 10.1089/scd.2008.0253.
- FOUILLARD, L. *et al.* (2008) 'Identification of IL-10 and TGF- $\beta$  transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells', *Gene Expression*, 13(4), pp. 217–226. doi: 10.3727/000000006780666957.
- Friedenstein, A. J., Piatetzky-Shapiro, I. and Petrakova, & K. V (1966) *Osteogenesis in transplants of bone marrow cells*, *Embryol. exp. Morph.*
- Galimberti, S. *et al.* (2009) 'Mesenchymal cells inhibit expansion but not cytotoxicity exerted by gamma-delta T cells', *European Journal of Clinical Investigation*, 39(9), pp. 813–818. doi: 10.1111/j.1365-2362.2009.02171.x.
- Galipeau, J. *et al.* (2009) 'Mesenchymal stromal cells cross-present soluble exogenous antigens as part of their antigen-presenting cell properties', *Blood*, 114(13), pp. 2632–2638. doi: 10.1182/blood-2009-02-207795.
- Gao, W. X. *et al.* (2017) 'Effects of mesenchymal stem cells from human induced pluripotent stem cells on differentiation, maturation, and function of dendritic cells', *Stem Cell Research and Therapy*. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), pp. 1–16. doi: 10.1186/s13287-017-0499-0.
- Gazdic, M. *et al.* (2017) 'Mesenchymal stem cells promote metastasis of lung cancer cells by downregulating systemic antitumor immune response', *Stem Cells International*, 2017. doi: 10.1155/2017/6294717.
- Ge, W. *et al.* (2010) 'Regulatory T-cell generation and kidney allograft tolerance induced by mesenchymal stem cells associated with indoleamine 2,3-dioxygenase expression', *Transplantation*, 90(12), pp. 1312–1320. doi: 10.1097/TP.0b013e3181fed001.

- Gerson, S. L. *et al.* (2000) 'Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy', *Journal of Clinical Oncology*, 18(2), pp. 307–316.
- Ghannam, S. *et al.* (2013) 'Correction: Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype', *The Journal of Immunology*, 191(11), pp. 5777–5777. doi: 10.4049/jimmunol.1390061.
- Gholamrezanezhad, A. *et al.* (2011) 'In vivo tracking of <sup>111</sup>In-oxine labeled mesenchymal stem cells following infusion in patients with advanced cirrhosis', *Nuclear Medicine and Biology*. Elsevier Inc., 38(7), pp. 961–967. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2011.03.008.
- Girdlestone, J. *et al.* (2015) 'Enhancement of the immunoregulatory potency of mesenchymal stromal cells by treatment with immunosuppressive drugs', *Cytotherapy*. Elsevier Inc, 17(9), pp. 1188–1199. doi: 10.1016/j.jcyt.2015.05.009.
- Gotherstrom, C. *et al.* (2005) 'Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells', *Hematopoietic Stem Cells*, 90(8), pp. 1017–1026.
- Gu, Y. *et al.* (2016) 'Changes in mesenchymal stem cells following long-term culture in vitro', *Molecular Medicine Reports*, 13(6), pp. 5207–5215. doi: 10.3892/mmr.2016.5169.
- Hajkova, M., Hermankova, B., *et al.* (2017a) 'Mesenchymal stem cells attenuate the adverse effects of immunosuppressive drugs on distinct T cell subpopulations', *Stem Cell Reviews and Reports*, 13(1), pp. 104–115. doi: 10.1007/s12015-016-9703-3.
- Hajkova, M., Javorkova, E., *et al.* (2017b) 'A local application of mesenchymal stem cells and cyclosporine A attenuates immune response by a switch in macrophage phenotype', *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11(5), pp. 1456–1465. doi: 10.1002/term.2044.
- Hijnen, D. *et al.* (2009) 'Cyclosporin A reduces CD4+CD25+ regulatory T-cell numbers in patients with atopic dermatitis', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Mosby, 124(4), pp. 856–858. doi: 10.1016/j.jaci.2009.07.056.
- Hof-Nahor, I. *et al.* (2012) 'Human mesenchymal stem cells shift CD8+ T cells towards a suppressive phenotype by inducing tolerogenic monocytes', *Journal of Cell Science*, 125(19), pp. 4640–4650. doi: 10.1242/jcs.108860.
- Hoogduijn, M. J. *et al.* (2008) 'Susceptibility of human mesenchymal stem cells to tacrolimus, mycophenolic acid, and rapamycin', *Transplantation*, 86(9), pp. 1283–1291. doi: 10.1097/TP.0b013e31818aa536.



- Hsu, W.-T. *et al.* (2013) ‘Prostaglandin E<sub>2</sub> potentiates mesenchymal stem cell–induced IL-10 + IFN- $\gamma$  + CD4 + regulatory T cells to control transplant arteriosclerosis’, *The Journal of Immunology*, 190(5), pp. 2372–2380. doi: 10.4049/jimmunol.1202996.
- Hu, Y. *et al.* (2018) ‘Comparative study on in vitro culture of mouse bone marrow mesenchymal stem cells’, *Stem Cells International*. Hindawi, 2018. doi: 10.1155/2018/6704583.
- Di Ianni, M. *et al.* (2008) ‘Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells’, *Experimental Hematology*, 36(3), pp. 309–318. doi: 10.1016/j.exphem.2007.11.007.
- Javorkova, E. *et al.* (2014) ‘Modulation of the early inflammatory microenvironment in the alkali-burned eye by systemically administered interferon- $\gamma$ -treated mesenchymal stromal cells’, *Stem Cells and Development*, 23(20), pp. 2490–2500. doi: 10.1089/scd.2013.0568.
- Javorkova, E. *et al.* (2018) ‘The effect of clinically relevant doses of immunosuppressive drugs on human mesenchymal stem cells’, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier, 97(October 2017), pp. 402–411. doi: 10.1016/j.biopha.2017.10.114.
- Jenkins, M., Schwartz, R. and Pardoll, D. (1988) ‘Effects of cyclosporine A on T cell development and clonal deletion’, *Science*. American Association for the Advancement of Science, 241(4873), pp. 1655–1658. doi: 10.1126/SCIENCE.3262237.
- Kavanagh, H. and Mahon, B. P. (2011) ‘Allogeneic mesenchymal stem cells prevent allergic airway inflammation by inducing murine regulatory T cells’, *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 66(4), pp. 523–531. doi: 10.1111/j.1398-9995.2010.02509.x.
- Kay, A. G. *et al.* (2017) ‘Mesenchymal stem cell- conditioned medium reduces disease severity and immune responses in inflammatory arthritis’, *Scientific Reports*. Springer US, (December), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-017-18144-w.
- Kern, S. *et al.* (2006) ‘Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue’, *Stem Cells*, 24(5), pp. 1294–1301. doi: 10.1634/stemcells.2005-0342.
- Keyhanmanesh, R. *et al.* (2018) ‘Systemic delivery of mesenchymal stem cells condition media in repeated doses acts as magic bullets in restoring IFN- $\gamma$ /IL-4 balance in asthmatic rats’, *Life Sciences*. Elsevier, 212(July), pp. 30–36. doi: 10.1016/j.lfs.2018.09.049.
- Kidd, S. *et al.* (2009) ‘Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging’, *Stem Cells*, 27(10), pp. 2614–2623. doi: 10.1002/stem.187.

- Kim, J. and Hematti, P. (2009) 'Mesenchymal stem cell-educated macrophages: A novel type of alternatively activated macrophages', *Experimental Hematology*, 37(12), pp. 1445–1453. doi: 10.1016/j.exphem.2009.09.004.
- Kraithman, D. L. *et al.* (2005) 'Dynamic imaging of allogeneic mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction', *Circulation*, 112(10), pp. 1451–1461. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.537480.
- Krampera, M. *et al.* (2006) 'Role for interferon- $\gamma$  in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells', *Stem Cells*, 24(2), pp. 386–398. doi: 10.1634/stemcells.2005-0008.
- Li, M. *et al.* (2014) 'Mesenchymal stem cells suppress CD8<sup>+</sup> T cell-mediated activation by suppressing natural killer group 2, member D protein receptor expression and secretion of prostaglandin E2, indoleamine 2, 3-dioxygenase and transforming growth factor- $\beta$ ', *Clinical and Experimental Immunology*, 178(3), pp. 516–524. doi: 10.1111/cei.12423.
- Lin, T. *et al.* (2018) 'NF $\kappa$ B sensing IL-4 secreting mesenchymal stem cells mitigate the proinflammatory response of macrophages exposed to polyethylene wear particles', *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 106(10), pp. 2744–2752. doi: 10.1002/jbm.a.36504.
- Liu, H. *et al.* (2012) 'Soluble molecules are key in maintaining the immunomodulatory activity of murine mesenchymal stromal cells', *Journal of Cell Science*, 125(1), pp. 200–208. doi: 10.1242/jcs.093070.
- Luz-Crawford, P. *et al.* (2012) 'Mesenchymal stem cells repress Th17 molecular program through the PD-1 pathway', *PLoS ONE*, 7(9). doi: 10.1371/journal.pone.0045272.
- Ma, X. *et al.* (2013) 'Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation ameliorates nephritis in lupus mice via inhibition of B-cell activation', *Cell Transplantation*, 22(12), pp. 2279–2290. doi: 10.3727/096368912X658692.
- Maitra, B. *et al.* (2004) 'Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation', *Bone Marrow Transplantation*, 33(6), pp. 597–604. doi: 10.1038/sj.bmt.1704400.
- Majumdar, M. K. *et al.* (1998) 'Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells', *Journal of Cellular Physiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 176(1), pp. 57–66. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199807)176:1<57::AID-JCP7>3.0.CO;2-7.
- Mazurier, C. *et al.* (2007) 'Immunosuppressive Effects of Mesenchymal Stem Cells: Involvement of HLA-G', *Transplantation*, 84(2), pp. 231–237. doi: 10.1097/01.tp.0000267918.07906.08.
- McCarthy, C. *et al.* (2011) 'Mesenchymal stem cell inhibition of T-helper 17 cell- differentiation is

triggered by cell-cell contact and mediated by prostaglandin E2 via the EP4 receptor', *European Journal of Immunology*, 41(10), pp. 2840–2851. doi: 10.1002/eji.201141499.

Meisel, R. *et al.* (2004) 'Brief report Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2, 3-dioxygenase – mediated tryptophan degradation', 103(12), pp. 4619–4622. doi: 10.1182/blood-2003-11-3909.Supported.

Miroux, C. *et al.* (2012) 'Corticosteroids do not reverse the inhibitory effect of cyclosporine on regulatory T-cell activity in contrast to mycophenolate mofetil', *Transplantation Proceedings*. Elsevier Inc., 44(9), pp. 2834–2839. doi: 10.1016/j.transproceed.2012.09.091.

Moore, K. *et al.* (1989) 'Homology of cytokine synthesis Inhibitory, 248.

Nasuno, M. *et al.* (2014) 'Mesenchymal stem cells cancel Azoxymethane-induced tumor initiation', *Stem Cells*, (32), pp. 913–925.

Nauta, A. J. *et al.* (2006) 'Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells', *The Journal of Immunology*, 177(4), pp. 2080–2087. doi: 10.4049/jimmunol.177.4.2080.

Di Nicola, M. *et al.* (2002) 'Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli', *Blood*, 99(10), pp. 3838–3843. doi: 10.1182/blood.V99.10.3838.

Normanton, M. *et al.* (2014) 'Interleukin 7 plays a role in T lymphocyte apoptosis inhibition driven by mesenchymal stem cell without favoring proliferation and cytokines secretion', *PLoS ONE*, 9(9), pp. 2–12. doi: 10.1371/journal.pone.0106673.

Ohshima, M. *et al.* (2012) 'Systemic transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells suppresses Th1 and Th17 T cell responses in experimental autoimmune myocarditis', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Elsevier Ltd, 53(3), pp. 420–428. doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.06.020.

Opitz, C. A. *et al.* (2009) 'Toll-like receptor engagement enhances the immunosuppressive properties of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by inducing indoleamine-2,3-dioxygenase-1 via Interferon- $\beta$  and protein kinase R', *Stem Cells*, 27(4), pp. 909–919. doi: 10.1002/stem.7.

Park, M. *et al.* (2015) 'Immune suppressive effects of tonsil-derived mesenchymal stem cells on mouse bone-marrow-derived dendritic cells', *Stem Cells International*, 2015, pp. 1–12. doi: 10.1155/2015/106540.

Patel, S. A. *et al.* (2010) 'Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF- $\beta$ ', *The Journal of Immunology*, 184(10), pp. 5885–5894. doi: 10.4049/jimmunol.0903143.

Peng, Y *et al.* (2015) 'Mesenchymal stromal cells infusions improve refractory chronic graft versus host disease through an increase of CD5+ regulatory B cells producing interleukin 10', *Leukemia*. Nature Publishing Group, 29(3), pp. 636–646. doi: 10.1038/leu.2014.225.

Perico, N. *et al.* (2011) 'Autologous mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: A pilot study of safety and clinical feasibility', *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 6(2), pp. 412–422. doi: 10.2215/CJN.04950610.

Perico, N. *et al.* (2018) 'Long-term clinical and immunological profile of kidney transplant patients given mesenchymal stromal cell immunotherapy', *Frontiers in Immunology*, 9(JUN), pp. 1–20. doi: 10.3389/fimmu.2018.01359.

Pischiutta, F. *et al.* (2014) 'Immunosuppression does not affect human bone marrow mesenchymal stromal cell efficacy after transplantation in traumatized mice brain', *Neuropharmacology*. Elsevier Ltd, 79, pp. 119–126. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.11.001.

Ponte, A. L. *et al.* (2007) 'The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities', *Stem Cells*, 25(7), pp. 1737–1745. doi: 10.1634/stemcells.2007-0054.

Prevosto, C. *et al.* (2007) 'Stem cell-lymphocyte interaction', *Haematologica*, 92(07), pp. 881–888.

Prud'homme, G. J. *et al.* (1995) 'Effects of cyclosporin A, rapamycin, and FK520 on peripheral T-cell deletion and anergy', *Cellular Immunology*. Academic Press, 164(1), pp. 47–56. doi: 10.1006/cimm.1995.1141.

Qu, Y. *et al.* (2018) 'Cyclosporin A inhibits adipogenic differentiation and regulates immunomodulatory functions of murine mesenchymal stem cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 498(3), pp. 516–522. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.03.012.

Rafei, M. *et al.* (2009) 'Mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting CD4 Th17 T cells in a CC chemokine ligand 2-dependent manner', *The Journal of Immunology*, 182(10), pp. 5994–6002. doi: 10.4049/jimmunol.0803962.

Ramasamy, R. *et al.* (2007) 'Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle', *Transplantation*, 83(1), pp. 71–76. doi: 10.1097/01.tp.0000244572.24780.54.

Rasmusson, I. *et al.* (2003) 'Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells', *Transplantation*, 76(8), pp. 1208–1213. doi: 10.1097/01.TP.0000082540.43730.80.

Rasmusson, I. *et al.* (2005) 'Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms', *Experimental Cell Research*, 305(1), pp. 33–41. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.12.013.

Ren, G. *et al.* (2008) 'Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide', *Cell Stem Cell*, 2(2), pp. 141–150. doi: 10.1016/j.stem.2007.11.014.

Ren, G. *et al.* (2010) 'Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression', *The Journal of Immunology*, 184(5), pp. 2321–2328. doi: 10.4049/jimmunol.0902023.

Ribeiro, A. *et al.* (2013) 'Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells', *Stem Cell Research and Therapy*, 4(5). doi: 10.1186/scrt336.

Ringden, O. *et al.* (2003) 'Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex', *Scandinavian Journal of Immunology*, 57(1), pp. 11–20. doi: 10.1046/j.1365-3083.2003.01176.x.

Ringdén, O. *et al.* (2006) 'Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease', *Transplantation*, 81(10), pp. 1390–1397. doi: 10.1097/01.tp.0000214462.63943.14.

Rosado, M. M. *et al.* (2014) 'Inhibition of B-cell proliferation and antibody production by mesenchymal stromal cells is mediated by T cells', *Stem Cells and Development*, 24(1), pp. 93–103. doi: 10.1089/scd.2014.0155.

\*Salami, F. *et al.* (2018) 'Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells on leukocytes with emphasis on neutrophils', *Immunobiology*. Elsevier, 223(12), pp. 786–791. doi: 10.1016/j.imbio.2018.08.002.

Schreiber, S. L. (1991) 'Chemistry and biology of the immunophilins their immunosuppressive ligands', *Science articles*, 251(4991), pp. 283–287.

\*Schreiber, S. L. and Crabtree, G. R. (1992) 'The mechanism of action of cyclosporin A and FK506', *Immunology Today*, pp. 136–142. doi: 10.1016/0167-5699(92)90111-J.

Segers, V. F. M. *et al.* (2005) 'Mesenchymal stem cell adhesion to cardiac microvascular endothelium: activators and mechanisms', *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 290(4), pp. H1370–H1377. doi: 10.1152/ajpheart.00523.2005.

Shigemoto-Kuroda, T. *et al.* (2017) 'MSC-derived extracellular vesicles attenuate immune responses in two autoimmune murine models: type 1 diabetes and uveoretinitis', *Stem Cell Reports*. Elsevier Company., 8(5), pp. 1214–1225. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.04.008.

Sioud, M. *et al.* (2010) 'Evidence for the involvement of galectin-3 in mesenchymal stem cell suppression of allogeneic T-cell proliferation', *Scandinavian Journal of Immunology*, 71(4), pp. 267–274. doi: 10.1111/j.1365-3083.2010.02378.x.

\*Sioud, M. (2011) 'New insights into mesenchymal stromal cell-mediated T-cell suppression through galectins', *Scandinavian Journal of Immunology*, 73(2), pp. 79–84. doi: 10.1111/j.1365-3083.2010.02491.x.

Spaggiari, G. M. *et al.* (2006) 'Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation.', *Blood*, 107(4), pp. 1484–90. doi: 10.1182/blood-2005-07-2775.

Starzl, T. E. *et al.* (2010) 'Liver transplantation with use of cyclosporin A and prednisone', *New England Journal of Medicine*, 305(5), pp. 266–269. doi: 10.1056/nejm198107303050507.

Sun, L. *et al.* (2010) 'Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus', *Arthritis & Rheumatism*. John Wiley & Sons, Ltd, 62(8), pp. 2467–2475. doi: 10.1002/art.27548.

Sung, J. H. *et al.* (2008) 'Isolation and characterization of mesenchymal stem cells', *Methods in Molecular Biology*, 40, pp. 2649–2654. doi: 10.1007/978-1-4614-9437-9\_3.

Tafti, Z. A. *et al.* (2018) 'Conditioned media derived from human adipose tissue mesenchymal stromal cells improves primary hepatocyte maintenance', *Cell Journal*, 20(3), pp. 377–387. doi: 10.22074/cellj.2018.5288.

Tatara, R. *et al.* (2011) 'Mesenchymal stromal cells inhibit Th17 but not regulatory T-cell differentiation', *Cytotherapy*, 13(6), pp. 686–694. doi: 10.3109/14653249.2010.542456.

\*Tedesco, D. and Haragsim, L. (2012) 'Cyclosporine: A Review', *Journal of Transplantation*, 2012, pp. 1–7. doi: 10.1155/2012/230386.

- Togha, M. *et al.* (2017) 'Rapamycin augments immunomodulatory properties of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune encephalomyelitis', *Molecular Neurobiology*. *Molecular Neurobiology*, 54(4), pp. 2445–2457. doi: 10.1007/s12035-016-9840-3.
- Toma, C. *et al.* (2009) 'Fate of culture-expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature', *Circulation Research*, 104(3), pp. 398–402. doi: 10.1161/circresaha.108.187724.
- Di Trapani, M. *et al.* (2016) 'Differential and transferable modulatory effects of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles on T, B and NK cell functions', *Scientific Reports*, 6(April), pp. 1–13. doi: 10.1038/srep24120.
- Tsuji, W. *et al.* (2015) 'Effects of immunosuppressive drugs influence on viability and susceptibility of adipose and bone marrow-derived mesenchymal stem cells', *Frontiers in Immunology*, 6(MAR), pp. 1–8. doi: 10.3389/fimmu.2015.00131.
- Ungerer, C. *et al.* (2014) 'Galectin-9 is a suppressor of T and B cells and predicts the immune modulatory potential of mesenchymal stromal cell preparations', *Stem Cells and Development*, 23(7), pp. 755–766. doi: 10.1089/scd.2013.0335.
- Vasilev, G. *et al.* (2019) 'Secretory factors produced by adipose mesenchymal stem cells downregulate Th17 and increase Treg cells in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients', *Rheumatology International*. Springer Berlin Heidelberg, 39(5), pp. 819–826. doi: 10.1007/s00296-019-04296-7.
- Vieira, P. L. *et al.* (2004) 'IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4 + CD25 + regulatory T cells ', *The Journal of Immunology*, 172(10), pp. 5986–5993. doi: 10.4049/jimmunol.172.10.5986.
- Wang, D. *et al.* (2014) 'A CD8 T cell/indoleamine 2,3-dioxygenase axis is required for mesenchymal stem cell suppression of human systemic lupus erythematosus', *Arthritis and Rheumatology*, 66(8), pp. 2234–2245. doi: 10.1002/art.38674.
- Wang, D. *et al.* (2018) 'An in vitro and in vivo study of the effect of dexamethasone on immunoinhibitory function of induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells', *Cell Transplantation*, 27(9), pp. 1340–1351. doi: 10.1177/0963689718780194.
- Wang, L. *et al.* (2019) 'Lung-resident mesenchymal stem cells promote repair of LPS-induced acute lung injury via regulating the balance of regulatory T cells and Th17 cells', *Inflammation*. *Inflammation*, 42(1), pp. 199–210. doi: 10.1007/s10753-018-0884-6.

- Waterman, R. S. *et al.* (2010) 'A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: Polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype', *PLoS ONE*, 5(4). doi: 10.1371/journal.pone.0010088.
- Webster, A. C. *et al.* (2005) 'Tacrolimus versus cyclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients', *Cochrane Database of Systematic Reviews*. doi: 10.1002/14651858.CD003961.pub2.
- de Witte, S. F. H. *et al.* (2018) 'Immunomodulation by therapeutic mesenchymal stromal cells (MSC) is triggered through phagocytosis of MSC by monocytic cells', *Stem Cells*, 36(4), pp. 602–615. doi: 10.1002/stem.2779.
- Wu, L. W. *et al.* (2014) 'Donor age negatively affects the immunoregulatory properties of both adipose and bone marrow derived mesenchymal stem cells', *Transplant Immunology*, 30(4), pp. 122–127. doi: 10.1016/j.trim.2014.03.001.
- Wynn Robert F *et al.* (2004) 'A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow', *Blood*, 104(9), pp. 2643–2645. doi: 10.1182/blood-2004-02-0526.I.B.
- Xu, G. *et al.* (2007) 'The role of IL-6 in inhibition of lymphocyte apoptosis by mesenchymal stem cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361(3), pp. 745–750. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.07.052.
- Yan, H. *et al.* (2014) 'Priming of Toll-like receptor 4 pathway in mesenchymal stem cells increases expression of B cell activating factor', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Inc., 448(2), pp. 212–217. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.04.097.
- Yan, Z. *et al.* (2015) 'Mesenchymal stem cells suppress T cells by inducing apoptosis and through PD-1/B7-H1 interactions', *Immunology Letters*. Elsevier B.V., 162(1), pp. 248–255. doi: 10.1016/j.imlet.2014.09.013.
- Ylöstalo, J. H. *et al.* (2012) 'Human mesenchymal stem/stromal cells cultured as spheroids are self-activated to produce prostaglandin E2 that directs stimulated macrophages into an anti-inflammatory phenotype', *Stem Cells*, 30(10), pp. 2283–2296. doi: 10.1002/stem.1191.
- Zhang, W., Qin, C. and Zhou, Z. M. (2007) 'Mesenchymal Stem Cells Modulate Immune Responses Combined With Cyclosporine in a Rat Renal Transplantation Model', *Transplantation Proceedings*, 39(10), pp. 3404–3408. doi: 10.1016/j.transproceed.2007.06.092.



Zhou, K. *et al.* (2008) 'Transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cell ameliorates the autoimmune pathogenesis in MRL/lpr mice', *Cellular and Molecular Immunology*, 5(6), pp. 417–424. doi: 10.1038/cmi.2008.52.